



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Chimie macromoléculaire et supramoléculaire

Présentée et soutenue par :

M. UGO VALENTIN TILL

le vendredi 23 septembre 2016

Titre :

ONCOPOL : VERS LE DEVELOPPEMENT CRITIQUE DE VECTEURS
POLYMERES POUR L'ONCOLOGIE

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Département Sciences Sociales, Environnementales et Biodiversité (SSEB-EIP)

Directeur(s) de Thèse :

M. ANNE FRANCOISE MINGOTAUD

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU

Rapporteurs :

M. DIDIER LECERF, UNIVERSITE DE ROUEN

M. THIERRY DELAIR, UNIVERSITE LYON 1

Membre(s) du jury :

M. ERIC BENOIST, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Président

M. ANNE FRANCOISE MINGOTAUD, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Membre

M. COLIN BONDUELLE, LABORATOIRE DE CHIMIE DE COORDINATION, Membre

M. ERWAN NICOL, UNIVERSITE DU MANS, Membre

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU, EI PURPAN, Membre

M. JEAN-OLIVIER DURAND, UNIVERSITE MONTPELLIER 2, Membre

“All in the golden afternoon
Full leisurely we glide;
For both our oars, with little skill,
By little arms are plied,
While little hands make vain pretence
Our wanderings to guide.”

Lewis Carroll

Remerciements :

S'il y a quelques mots qu'il ne faut pas oublier, c'est que même si on fait son parcours seul, on travaille toujours avec les autres, et c'est encore plus vrai dans une thèse qui ne peut être menée à bout tout seul.

Je voudrais donc commencer par les deux personnes qui ont eu l'instant de folie, qu'ils regrettent probablement, de me proposer de continuer après mon stage de M2. A ceux qui ont eu la bonté de me croire capable de mener ce projet à bien et de me faire confiance durant toute cette thèse entre trois laboratoires (et demi) et en faisant tellement d'allers-retours que personne ne pouvait savoir où j'étais à un instant t. A eux qui m'ont supporté du début à la fin je voudrais dire un grand merci. Anne-Françoise Mingotaud merci pour le travail fou, toujours fait à temps, toujours là à répondre, toujours à me soutenir, et pour les quelques rares coups de pieds au derrière qui furent nécessaires. Frédéric Violleau pour avoir accepté que je commence en ne sachant rien à son domaine, pour ces conférences et sa confiance, merci.

Merci à vous, lecteurs, membres du jury et principalement mes rapporteurs, Mr le Pr Thierry Delair qui après m'avoir eu en M2 accepte tout de même de lire mon manuscrit, et Mr le Pr Didier Le Cerf qui a eu la bonté de faire de même.

Et puis vient le temps de remercier les trois laboratoires et tous leurs membres :

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à l'IPBS, Marie-Pierre Rols qui m'a beaucoup impressionné au premier entretien, Muriel Golzio, et surtout Laure Gibot pour m'avoir appris une grande partie de ce que je sais en bio et avoir partagé sans compter son savoir, répondant à mes questions les plus stupides sans arrière-jugement.

Merci à tous ceux de l'EI Purpan, Hélène Missonnier, Alban Jacques, Marielle Pages, Simon Duthen, Sophie Moureu et j'en oublie forcément. Mais aussi à Romain Pierron pour m'avoir fait l'honneur d'être mon Ariégeois que je croisais au travail, pour toutes nos discussions et sa bonne humeur. Merci surtout à Mireille Gaucher sans qui les expériences AsFIFFF auraient été impossibles, pour son intérêt pour mon travail et pour son aide plus que précieuse.

Merci à tous ceux de l'IMRCP que j'ai vus encore plus souvent, Jean Daniel Marty, Marie Bélières, Florence Frechou et Stéphane Gineste pour les discussions matinales et leur aide. Mais aussi à tous les autres permanents et non-permanents, plus particulièrement Christophe Mingotaud pour ses apports dans les discussions et les rajouts qui m'ont fait rire, Clément Roux pour supporter mes discussions, scientifiques comme non scientifiques avec tact, et Pascale Saint-Aguet pour son aide précieuse lors des manipulations.

Merci à tous ceux du bureau 3034, ceux qui sont partis ailleurs comme Stéphane pour m'avoir aidé et pour m'avoir relancé sur les formules longues comme le bras dans Excel. Ceux qui vont encore rester là quelques années, Baptiste(Maxime) pour s'être amusé sur Excel avec moi, pour ta bonne humeur même quand je t'embête, Anaïs pour ta bonne humeur et la tête que tu as faite en reconnaissant Hangover qui restera dans ma mémoire, ceux qui sont passés le temps d'un stage, principalement Andrew pour m'avoir aidé peut-être plus que je t'ai aidé, merci pour la bonne entente, pour les gâteaux, pour la bonne humeur, pour l'ambiance propice au travail, je laisse ma place près du radiateur, aux armes et battez-vous.

Merci aussi à Barbara Lonetti et Pierre Joseph pour m'avoir accueilli à Florence chez eux sans autres questions, pour leur aide autant sur les manipulations que sur le reste.

Merci à toute l'équipe de Kim S.R. Williams à Golden, particulièrement James Oliver pour ces discussions et cette petite ballade, Carmen Bria sans qui le SyFIFFF aurait été un calvaire, et pour avoir pris du temps alors qu'il était pressé par d'autres choses et pour tout ce que tu as fait. Ainsi que Williams (Billy) C. Smith pour sa bonne humeur et ses conseils. Merci aussi à Tace Rand pour m'avoir aidé tout au long du séjour, pour ses discussions en anglais comme en français.

Merci à tous ceux que je connais peu mais qu'il me fait plaisir de revoir durant les conférences, Guillaume Greyling pour les discussions FFF, Robin de Kruijff pour celles sur les nano-objets, Maxime Bokseveld pour le Zeta, merci à tout ceux de Wyatt France sans qui tout cela aurait été bien plus compliqué, et bien d'autres ...

Merci aux différents services, la RMN, la TEM, et tous ceux qui m'ont aidé.

Merci à ceux qui m'ont aidé au MHT et ceux avec qui j'ai partagé la salle de biologie : Patricia Viciendo, pour m'avoir supporté, m'avoir aidé et avoir accepté que je râle beaucoup. Julie pour ces quelques mois où j'ai eu l'impression de pouvoir t'apprendre quelque chose et t'être utile, Béatrice Moukarzel pour m'avoir appris tout ça et m'avoir aidé autant en bio qu'en physico-chimie, tous ceux qui ont travaillé là-bas pour avoir su donner du leur pour que la salle de biologie soit vraiment partagée et que tous puissent travailler.

Mais aussi, voire surtout, à Amélie pour tout. Non contente de me supporter en dehors du travail, elle m'a grandement aidé dans cette thèse autant scientifiquement qu'à supporter les moments plus difficiles, et je peux dire sans difficulté que sans elle j'aurais discrètement été pendu par mes maitres de thèse.

Merci à ma famille, à sa famille, à notre famille, à tous ceux qui m'ont aidé pendant tout ce temps. Merci à la ménagerie pour avoir su égayer mes journées et m'apprendre/m'obliger à prendre du temps pour autre chose que le travail, Jabb, Freyja, Hywyn et tous les autres ...

Merci aussi à Juan Limon Peterson, sans qui j'aurais arrêté la recherche.

Comme quoi, une thèse c'est aussi un parcours, un avant qui nous a mené là, et un après qui j'espère me mènera loin, et tout ça grâce à tous ceux que j'ai pu croiser même juste le temps d'une discussion. Merci.

Table des matières

Remerciements :	1
Table des matières	3
Introduction Générale	6
I. Bibliographie	9
1. La thérapie photo-dynamique (PDT)	9
a. Principe	9
b. PDT et oxygène singulet	10
c. Les photosensibilisateurs utilisés en PDT	11
d. Encapsulation des Photosensibilisateur	14
e. Conclusion	15
2. Objets auto-assemblés	17
a. Un domaine fortement utilisé pour la nanomédecine	17
b. Ciblage	18
c. Des nanovecteurs polymères	20
d. Les assemblages amphiphiles	20
e. Les assemblages poly-ioniques	22
f. Réticulation d'objet	24
g. Synthèse des Nano-objets polymères	25
h. Conclusion	25
3. Caractérisations usuelles des nano-vecteurs polymères	26
a. Diffusions statique (SLS) et dynamique (DLS) de la lumière	27
b. Potentiel Zéta	31
4. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AsFIFFF)	34
a. Pourquoi les méthodes FFF ?	34
b. La théorie du fractionnement flux force (FFF)	34
c. Différentes FFF	35
d. Les cas du (Sy)FIFFF et de l'AsFIFFF	37
e. Le cas du Frit inlet	39
f. Conclusion	40
5. Biologie et modèles de culture	41
a. Le cas des cancers	41
b. Différentes lignées cellulaires	42
c. De la 2D à la 3D et choix du modèle	44
d. Le Modèle Sphéroïde	46
e. Analyse des sphéroïdes	48
f. Conclusion	49
6. Cadre de l'étude	50
a. Philosophie	50
b. Outils	50
c. Introduction au développement	50
II. Des vecteurs hydrophobe-hydrophile	52

1.	Introduction	52
2.	Objets de type micellaire	53
a.	Introduction	53
b.	Etude physicochimique usuelle des objets micellaires.....	53
c.	Analyse DLS/SLS	55
d.	Stabilité dans le temps et délivrance	60
e.	Effet biologique.....	62
3.	Polymèresomes.....	70
a.	Introduction	70
b.	Analyse TEM et AFM	71
c.	Analyse DLS/SLS	74
d.	Analyse AsFIFFF	78
e.	Comparaison des méthodes	84
f.	Effet biologique en PDT.....	85
4.	Conclusion générale	87
III.	Réticulation	89
1.	Introduction	89
2.	Formation des micelles réticulées	90
3.	Analyse des objets.....	94
a.	Analyse physico-chimique.....	94
b.	Analyse de stabilité et relargage.....	98
4.	Comportement biologique.....	104
c.	En culture 2D.....	104
d.	En culture 3D ou sphéroïdes	105
5.	Conclusion.....	114
IV.	Mélanges.....	117
1.	Introduction	117
2.	Analyse DLS	118
3.	Analyse par AsFIFFF.....	122
4.	Analyses biologiques et efficacité PDT.....	125
5.	Conclusion.....	130
V.	PICs.....	132
1.	Introduction	132
2.	Analyses classiques et leurs limites.....	134
3.	Analyse Frit-SyFIFFF à Golden	135
4.	Analyse FI-AsFIFFF à Purpan.....	138
a.	Recouvrement et différents PICs	138
b.	Caractérisation en présence de Sel.....	143
c.	Assemblage des PICs en fonction du ratio	147
d.	Etudes FI-AsFIFFF des différentes charges dans les PICs PAPTAC-PNIPAM	154
5.	Etude biologique	158
6.	Conclusion.....	161
	Conclusion générale.....	163
	Annexes.....	165

Perspectives et ouverture sur une autre thèse	166
a. Présentation.....	166
b. Interactions avec les GUV et effet d'une illumination	166
c. Effet du vecteur.....	168
d. Conclusion.....	170
Matériel et méthode :.....	171
Produits chimiques.....	171
Fonctionnalisation acrylate.....	171
Préparation de micelles polymères par addition de solvant	171
Préparation d'auto-assemblages polymères par réhydratation de film.....	172
Réticulations.....	172
Chargement des micelles avec Phéo.....	172
Expériences de dialyse	173
Formation des PICs.....	173
Suivi de Dialyse PICs en solutions salines.....	173
Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	174
Microscopie électronique à transmission (TEM)	174
Fractionnement Flux Force (FFF)	174
Asymetric Flow Field-Flow Fractionation (AsFIFFF)	174
Méthode : micelles de 5 à 30nm.....	175
Méthode : Polymersomes allongés type PEO-PCL 2000-7000.....	175
Méthode : Mélange de micelles et de polymersomes PEO-PCL 5000-11000.....	175
Méthode : Polymersomes complexes PEO-PCL 2000-4800.....	175
Frit Inlet Symmetrical FFIF (FI-FIFF).....	175
Frit-Inlet (FI) AsFIFFF	176
Biologie.....	176
Culture cellulaire	176
Cytotoxicité et photocytotoxicité de micelles polymères chargées en Phéo	176
Génération de sphéroïdes de tumeur 3D	177
Thérapie photodynamique sur sphéroïdes.....	177
Analyse biologique des sphéroïdes.....	177
Photocytotoxicité des sphéroïdes.....	177
Validation de méthode	178
Le Logiciel STORMS	181
Development and use of STORMS software.....	181
Utilisation du logiciel STORMS	184
Figures.....	187
DLS-TEM	187
Analyse UV-Visible	195
Effet du Phéophorbide-A non vectorisé	195
Références :.....	199

Introduction Générale

Depuis de nombreuses années le cancer est reconnu comme cause nationale en France mais aussi dans d'autres pays, et même si la découverte de nouvelles molécules anticancéreuses ou de traitements classiques d'autres maladies ralentit d'année en année, des médicaments toujours plus efficaces apparaissent néanmoins sur le marché.

Si ces évolutions viennent parfois d'adjuvants simples ou de nouvelles molécules, la tendance actuelle est à la vectorisation des principes actifs par des nano-objets. La théorie de la « magic bullet » née au début du XXe siècle et théorisée par Paul Ehrlich a ouvert la place aux nano-matériaux et à divers transporteurs.

Il existe de nos jours des dizaines de façons de vectoriser un médicament, le portant de son point d'administration à sa cible en passant les différentes barrières du corps humain, notamment des vectorisations impliquant des polymères.

En effet, les énormes progrès effectués en ingénierie polymère depuis 25 ans a permis la synthèse de copolymères à structure de mieux en mieux contrôlée et associant des monomères variés grâce aux polymérisations par ouverture de cycle, par voie radicalaire ou anionique. Ceci donne lieu à une recherche très variée, des micelles aux polymersomes en passant par les assemblages de complexe poly-ionique (PIC), certains de ces systèmes sont même déjà utilisés pour des médicaments actuellement sur le marché. Le nombre d'études présentant l'encapsulation de principes actifs dans des nano-objets polymères a littéralement explosé en vingt ans. Cette littérature très riche nécessite l'implication de compétences très différentes, allant parfois de la synthèse de polymères eux-mêmes jusqu'à l'administration *in vivo*. Etant donné l'ampleur des points à examiner, de nombreuses études franchissent rapidement les étapes de la formation d'auto-assemblages à l'application biologique sans avoir réalisé un examen approfondi du vecteur. Afin de pallier cet inconvénient, le but de cette thèse était d'examiner si une évaluation parallèle de la formation et de la caractérisation des nanovecteurs ainsi que de l'activité biologique pouvait amener une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu et par là même un développement plus critique des nanovecteurs. Le cadre thérapeutique que nous avons choisi est la thérapie photodynamique (PDT) contre le cancer.

L'approche proposée utilise d'abord une caractérisation physico-chimique minutieuse des vecteurs par les techniques classiques d'analyse en batch (diffusion dynamique de la lumière, microscopie électronique, microscopie à force atomique) et le fractionnement flux force, plus précisément l'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AsFFFF) couplée à des détecteurs adéquats (UV-Visible, réfractomètre, diffusion de la lumière) [1]. Cela nous permet de caractériser complètement les vecteurs concernant leur polymorphisme éventuel (et individuellement les différentes familles d'objets), la taille dans le milieu, ainsi que la charge en photosensibilisateur.

Des données sur des micelles, polymersomes et PICs seront présentées ici.

Comme expliqué dans le chapitre 1, la majeure partie des auto-assemblages polymères présentent une gamme de taille de 20-200 nm dans l'optique de se situer dans la zone favorable à l'effet "Enhanced Permeability and Retention" (EPR) ainsi qu'à la circulation dans le flux sanguin. Cependant, dans certain cas, ces nano-objets montrent la présence de différentes populations de nanovecteurs.

Les polymères utilisés sont des objets pour la plupart déjà connus du laboratoire, ils sont choisis avec un polymère extérieur PEO déjà utilisé extensivement dans le cadre des vecteurs et facile à mettre en place autant qu'à mettre en œuvre. Une variété de polymères spécifiques sera présentée au

fur et à mesure de leur utilisation, ils ont été choisis car ils étaient connus pour former des micelles ou des polymersomes permettant ainsi de garder une grande variété de possibilité.

Ainsi pour comprendre l'influence des différentes formes, ou résistances des vecteurs et des impuretés, des mélanges contrôlés de différents nano-objets ont également été étudiés, ainsi que des systèmes réticulés.

Pour chaque nouveau vecteur, nous avons analysé sa capacité à transporter un photosensibilisateur (phéophorbide a). L'activité de PDT dans une culture cellulaire soit 2D soit 3D est présentée et comparée sur les différents lots, en liaison avec l'analyse de la pureté.

Plusieurs points sensibles ont ainsi été soulevés et nous apportons de possibles solutions à ceux-ci.

Nous avons ainsi étudié la comparaison des effets entre la 2D et la 3D dans le domaine de la culture cellulaire soulignant les limites de la première qui sont bien connues des biologistes mais peut-être pas assez par les physico-chimistes.

Ce travail va donc se présenter en cinq grands chapitres :

Dans un premier chapitre nous analyserons l'ensemble de la bibliographie qui nous a semblé utile à la bonne compréhension des problèmes que nous affrontons. Il sera axé autour de grands thèmes tels que la PDT, les nano-objets, leurs caractérisation par des méthodes classiques, l'apport de l'AsFIFFF et enfin une partie biologie.

Nous traiterons ensuite dans un grand chapitre les micelles et les polymersomes "simples" que nous avons formés. Dans un souci de clarté le chapitre comportera deux parties et nous traiterons dans un premier temps des micelles puis des polymersomes.

Les objets réticulés seront ensuite abordés ainsi que l'impact de leurs résultats dans la comparaison des méthodes d'analyse biologique 2D ou 3D.

Dans l'optique d'étudier l'influence des impuretés pouvant être retrouvées dans les nano-objets et mal perçues par la diffusion dynamique de la lumière, nous avons formé des mélanges contrôlés de différents micelles et polymersomes et les avons utilisés comme vecteur.

Ensuite nous traiterons des PICs, et principalement de l'analyse de petits objets PICs en Frit-Inlet FFF qui a été mise au point durant cette thèse.

Enfin, nous essayerons de conclure sur le but initial de cette thèse qui est d'amener une analyse critique des vecteurs polymères pour l'oncologie par le biais de la PDT.

Chapitre 1 : Bibliographie

I. Bibliographie

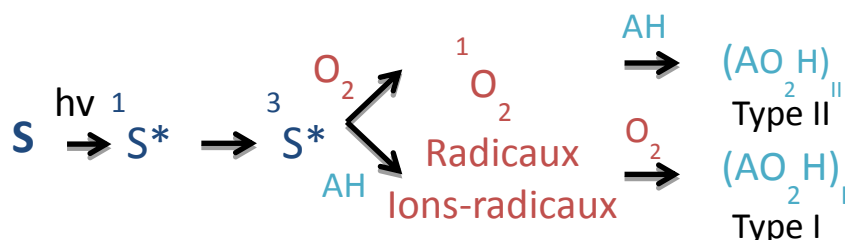
Ce chapitre a pour objectif de présenter un aperçu des travaux antérieurs dont le contenu a été utile à cette thèse. Etant donné la vaste étendue des domaines abordés, il a fallu faire des choix dans l'organisation et la présentation de la bibliographie. Une première partie portera sur le concept de thérapie photodynamique pour expliquer pourquoi il est intéressant de développer des vecteurs. Ceux-ci seront alors décrits d'une façon générale dans la deuxième partie, puis leur caractérisation dans les parties 3 et 4. Enfin, la dernière partie reviendra sur les aspects de biologie en lien avec les cancers, points qu'il fallait maîtriser pour mener à bien ce travail.

1. La thérapie photo-dynamique (PDT)

a. Principe

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis longtemps. Ainsi il y a 3000 ans, les égyptiens utilisaient la lumière et des extraits d'ombellifères pour le traitement d'une maladie cutanée appelé Vitiligo. Aujourd'hui le secret du traitement du vitiligo est connu et est attribué à l'effet photodynamique des molécules photo-activables présentes dans l'extrait végétal, en l'occurrence des psoralènes. Ce traitement fait appel à un protocole thérapeutique appelé thérapie photodynamique (PDT).

Actuellement, la thérapie photodynamique est utilisée en dermatologie, ophtalmologie et dans le traitement de certains cancers. La PDT est un concept basé sur une activation sélective par une lumière dans le visible de médicaments dits « photoactivables » ou « photosensibilisateurs » tels que des dérivés des porphyrines. Ces derniers, non toxiques en absence d'une excitation lumineuse, génèrent à l'état excité, de façon transitoire, des espèces très actives comme l'oxygène singulet et des radicaux libres [2]. Du fait de leur très faible durée de vie, l'action primaire de ces espèces est limitée dans l'espace à une échelle moléculaire ou, au plus, à celle des organites cellulaires. Cette sélectivité d'action est exploitée en photochimiothérapie qui permet grâce une irradiation lumineuse localisée d'éradiquer les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines. Cette sélectivité est encore renforcée par la propriété de certains tissus, en particulier les tumeurs ou d'autres tissus prolifératifs caractérisés par une forte néovascularisation, de retenir les Photosensibilisateur. Les Photosensibilisateur activés par la lumière vont réagir avec les milieux biologiques via deux réactions photochimiques compétitives nommées réactions de type I ou de type II. (Schenck [3] et Foote quelques années plus tard [4]).



Dans le mécanisme de Type I, le photosensibilisateur à l'état excité réagit avec AH (une molécule possédant un proton) par un mécanisme de transfert d'électrons, ou d'un atome d'hydrogène, pour donner une paire de radicaux libres. Ceux-ci réagissent avec l'oxygène pour régénérer le photosensibilisateur et former des radicaux peroxyde ou l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Dans les réactions de type II, le photosensibilisateur réagit directement avec l'oxygène par transfert d'énergie pour générer l'oxygène singulet.

Les photosensibilisateurs peuvent donc réagir avec le milieu environnant et notamment avec les composants cellulaires tels que les phospholipides pour induire des peroxydations lipidiques, avec certains acides aminés (Met, His, Trp, Lys) pour inactiver des enzymes, avec l'ADN pour former des dimères de thymine, des oxydations des bases principalement au niveau des guanines, des alkylations, ou encore des coupures de la double hélice. Ces effets phototoxiques des photosensibilisateurs ont été mis à profit dans le cadre du développement d'agents antitumoraux (dérivés des porphyrines) pour la PDT. Malheureusement ces réactions de photosensibilisation peuvent également être à l'origine des effets secondaires, parfois graves.

b. PDT et oxygène singulet

L'oxygène est un très bon acteur de ces réactions de photosensibilisation grâce à sa nature électronique et particulièrement celle de son état excité (Figure I-1). Ces états diffèrent de par le placement des deux électrons de la plus haute orbitale occupée (deux orbitales anti-liantes de même énergie) $2p\pi^*$.

A l'état fondamental noté $O_2(^3\Sigma_g^-)$ (ici à gauche), il possède un caractère triplet qui explique son paramagnétisme et son aptitude à réagir directement avec certains composés organiques dont l'état fondamental est singulet ainsi que sa capacité à se combiner à des radicaux carbonés.

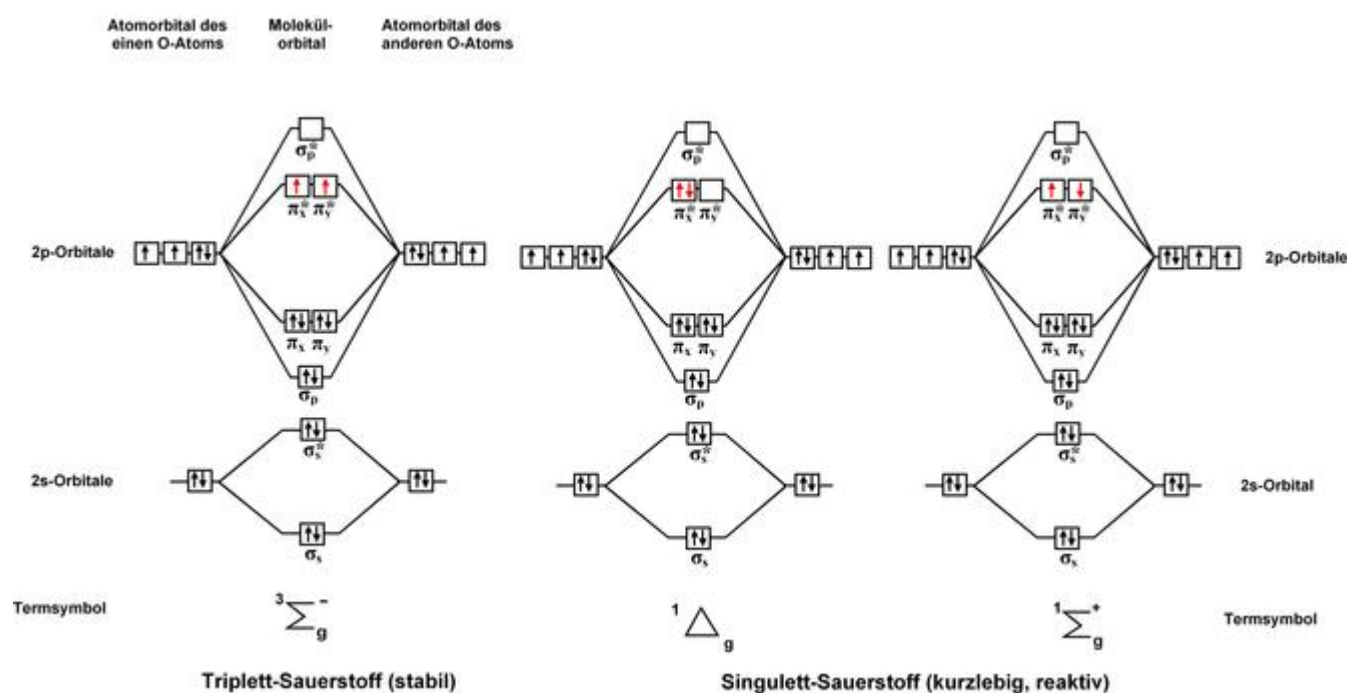


Figure I-1 : Orbitales de l'oxygène (libre de droit)

Il possède en outre deux états excités singulets appelés $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$. Ces deux états sont dits singulet puisque leur multiplicité de spin est égale à 1, leur spin total est quant à lui égal à 0. Les deux autres états excités singulet $O_2(^1\Sigma_g^+)$ et $O_2(^1\Delta_g)$ diffèrent par leur mode d'occupation des orbitales $2p\pi^*$ et possèdent des énergies respectives de $157,2\text{kJ.mol}^{-1}$ et $94,5\text{ kJ.mol}^{-1}$ [5, 6]. L'état $O_2(^1\Delta_g)$ est une espèce électrophile et particulièrement connue dans les réactions de Diels-Alder. Quant à la forme $O_2(^1\Sigma_g^+)$, elle est beaucoup moins connue et semble s'apparenter à $O_2(^3\Sigma_g^-)$. Cependant il est admis que la forme $O_2(^1\Sigma_g^+)$ subit une conversion extrêmement rapide vers la forme $O_2(^1\Delta_g)$.

C'est à partir de cet état que l'on considère la réactivité de l'oxygène singulet. En solution aqueuse, sa durée de vie est d'environ $5\mu\text{s}$ et son rayon de diffusion est estimé à 5 nm [6, 7].

L'efficacité de la PDT est dépendante de la présence en quantité suffisante ($>2\%$) d'oxygène dans les tissus [8, 9]. Les cellules cancéreuses ont une tendance à l'hypoxie. Ce manque d'oxygène est à l'origine de la production de facteurs HIF (Hypoxia Inducible Factors) qui sont des protéines agissant comme facteurs de transcription dans tous les tissus et régulent le niveau d'oxygène au cours de la PDT [10, 11]. La distribution de l' 1O_2 dans les tissus tumoraux est souvent hétérogène [12]. Les cellules situées dans les régions tumorales hypoxiques sont plus résistantes à la PDT.

L'effet photodynamique dépend également de la demi-vie de l'oxygène singulet (1O_2) et de sa distance de diffusion. Le temps de vie intracellulaire de 1O_2 est évalué à environ $3\mu\text{s}$ [13]. Sa diffusion intracellulaire est estimée à $2-4 \cdot 10^{-6}\text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [14]. Il est important de constater que même dans de petites tumeurs la concentration en oxygène peut être bien différente en fonction de la profondeur et par rapport aux tissus sains.

Grace à sa luminescence à 1270 nm , il est maintenant possible de détecter l'oxygène singulet produit *in vivo* au cours de la photo-activation de photosensibilisateurs tel que l'acide amino lévulinique précurseur de la protoporphyrin IX [15]. Ceci a permis de mettre en évidence *in vivo* de façon univoque une relation entre génération d'oxygène singulet et réponse photobiologique.

c. Les photosensibilisateurs utilisés en PDT

La plupart des photosensibilisateurs utilisés en PDT sont des macrocycles tétrapyrroliques tels que des porphyrines, des chlorines, des bactériochlorines ou des phthalocyanines (Figure I-2). Ces composés possèdent un cycle à 18 électrons π ce qui leur confère un caractère aromatique à l'origine de leur forte absorption de la lumière, la modification du système π permettant de modifier leur spectre d'absorption. Il existe également des photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques comme les hypericines, les hypocrellines et les prenylenequinones.

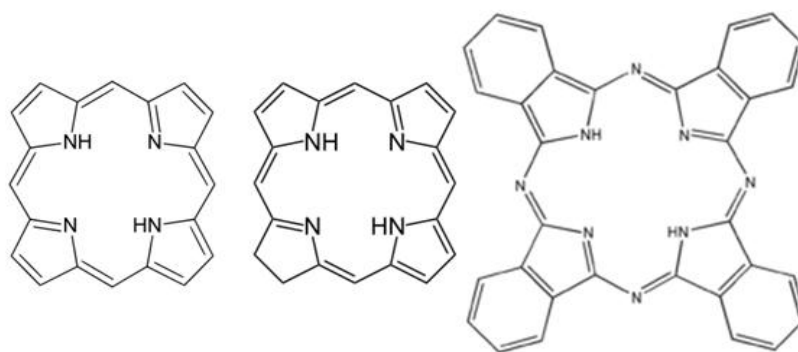


Figure I-2 : Porphyrine, Chlorine, Phthalocyanine

Idéalement un bon photosensibilisateur doit répondre à de nombreux critères tels que :

- Posséder une forte absorption dans la lumière rouge ($\lambda > 650\text{nm}$) car la bande d'absorption entre 600 et 800 nm correspond à la fenêtre de transparence de l'hémoglobine.
- Avoir un bon rendement en oxygène singulet dans cette même fenêtre
- Etre non cytotoxique dans l'obscurité
- Etre stable vis-à-vis des enzymes circulantes
- Avoir un bon tropisme pour les cellules tumorales
- Avoir une bonne photostabilité (évitant le "bleaching" ou blanchissement)
- Avoir une faible agrégation en milieu biologique, les formes agrégées ayant des comportements différents.
- S'éliminer rapidement de l'organisme

L'hématoporphyrine (HpD) et ses dérivés ont été les premiers Photosensibilisateur à être utilisés en clinique dans le traitement des cancers. Ils constituent la première génération de photosensibilisateur. Cependant, ils présentent beaucoup de limites. Il s'agit d'un mélange complexe dont certains composants ne sont pas photoactifs, avec une faible accumulation au niveau des tumeurs et un fort taux d'agrégation qui diminue l'efficacité du traitement PDT. En 1987 la fonction active de la Hp, la dihématoporphyrine éther est isolée [16] et commercialisée sous le nom de Photofrin®. La limitation la plus importante de ces médicaments est principalement leur longue durée d'élimination (et donc de photosensibilisation du patient) et leur absorption dans l'UV responsables d'effets secondaires importants tels qu'une forte phototoxicité cutanée. Depuis 1980 on a pu voir apparaître trois générations de photosensibilisateur.

Les photosensibilisateurs de seconde génération tentent de pallier ces deux problèmes. Ils sont pour la plupart purs, avec une forte absorption dans le rouge et un rendement quantique élevé en oxygène singulet dans ce domaine d'absorption [17]. De plus leur élimination est rapide, limitant les problèmes éventuels de phototoxicité [18]. Quelques exemples sont présentés dans la Figure I-3, utilisés en ophtalmologie (Visudyne®) comme en cancérologie (Foscan®). Depuis 2002, la tétra- (méta-hydroxyphényl) chlorine (m- THPC), connue sous le nom de Foscan®, est la molécule commercialisée la

plus active en PDT (en France). En effet, elle est 25 à 30 fois plus efficace que la HpD ou le Photofrin®. Cependant, le Foscan demeure un photosensibilisateur peu sélectif vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ce composé s'est avéré néanmoins un bon candidat pour les traitements des cancers de la prostate.

Parmi les photosensibilisateurs de seconde génération commercialisés, on peut également citer le 5-ALA (acide 5 aminolevulinique) qui est le premier promédicament (Lévulan®) (autorisation de mise sur le marché en France en 2000). Le 5-ALA conduit par un mécanisme biosynthétique à la formation *in situ* de la protoporphyrine IX. Ce photosensibilisateur est actuellement utilisé pour les traitements en PDT des cancers cutanés et gastro-intestinaux et des lésions précancéreuses.

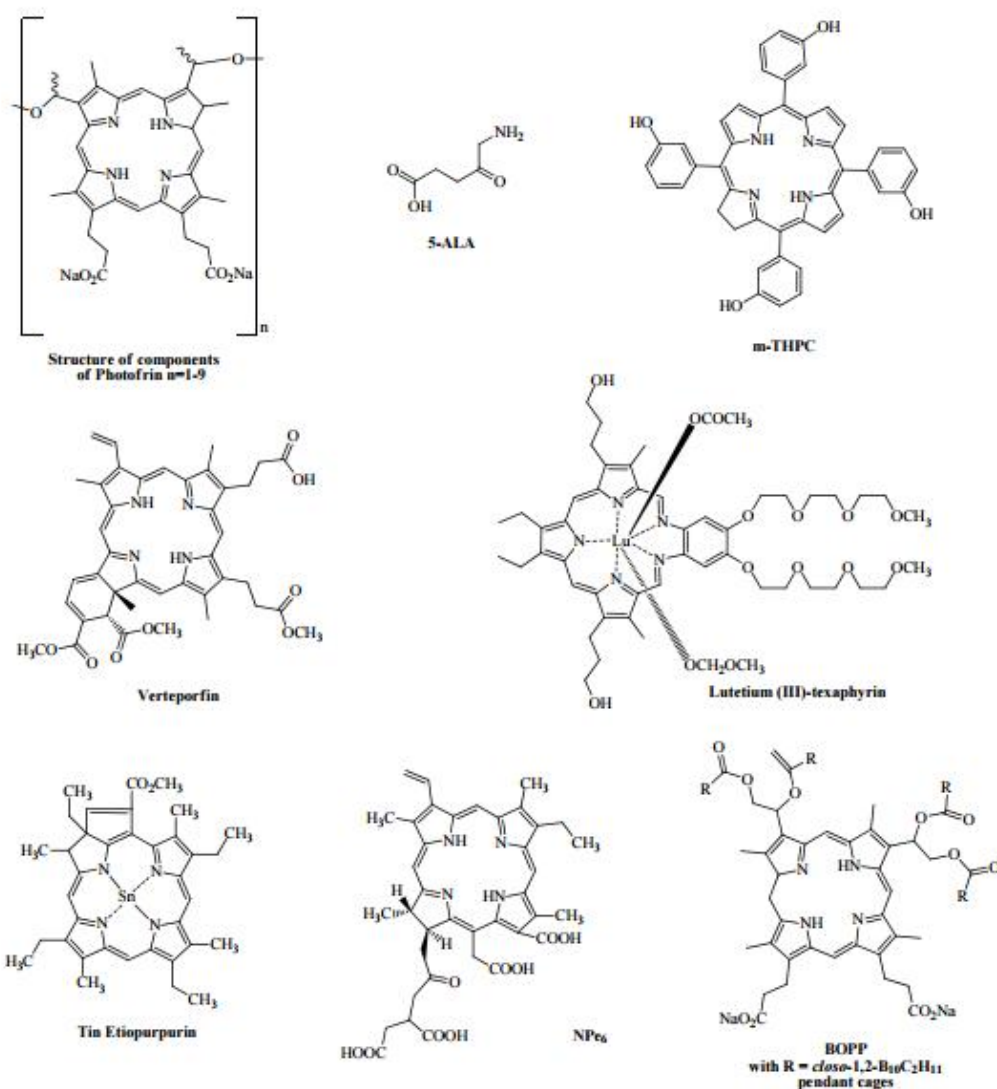


Figure I-3 : Structure de différents photosensibilisateurs non Phthalocyanine de Type II sauf PhotoFrin (Type I) [19]

D'autres photosensibilisateurs peuvent être obtenus à partir d'une synthèse partielle des précurseurs en abondance dans la nature comme le protohème et la chlorophylle... . Dans cette famille, on retrouve un grand nombre de chlorines d'origine naturelle. En effet, elles sont extraites facilement à partir nombreuses plantes et d'algues (spirulines).

Cependant ces photosensibilisateurs de seconde génération restent encore peu spécifiques des cellules tumorales. Pour pallier cet inconvénient, différentes stratégies ont été développées pour

adresser sélectivement les photosensibilisateurs à leur cible et augmenter leur affinité pour les tissus tumoraux. Ces composés ciblés constituent la troisième génération.

Les photosensibilisateurs de troisième génération regroupent en grande majorité des porphyrines substituées par des motifs de vectorisation et d'adressage tumoral [20, 21]. Ces motifs sont généralement des biomolécules telles que des stéroïdes, des sucres pour rendre par exemple à la fois le photosensibilisateur plus hydrophile et sélectif du rétinoblastome, des amines telles que la spermine, des acides aminés, des peptides type RGD, de la neuropiline, des anticorps monoclonaux par exemple anti EGF, qui peuvent être reconnus spécifiquement par les cellules cancéreuses. Ces stratégies induisent une augmentation nette de l'activité photodynamique du photosensibilisateur.

Toujours dans l'objectif d'augmenter l'efficacité de la PDT, des photosensibilisateurs pouvant être activés par une excitation à deux photons sont développés. Les avantages de cette technique par rapport à la PDT classique résident en une meilleure pénétration de la lumière en milieu biologique et une importante sélectivité spatiale, minimisant le risque de détruire accidentellement des tissus sains.

d. Encapsulation des Photosensibilisateurs

De multiples freins à la PDT peuvent être répertoriés parmi lesquels:

- Une hydrophobicité des photosensibilisateurs qui a tendance à en faire des cibles du système immunitaire
- Une mauvaise biodisponibilité en découlant
- Le problème de π - π stacking des cycles conduisant à une moindre efficacité
- La photosensibilisation du patient sur plusieurs jours

Afin d'améliorer la PDT, des formulations nanométriques de photosensibilisateur ont été évaluées, car une telle taille du vecteur permet son accumulation dans les tumeurs solides grâce à l'amélioration de la perméation et la rétention d'effet (EPR), ce qui sera décrit dans le paragraphe 2 de ce chapitre. L'une de ces formulations utilise des liposomes, qui sont des multi-couches auto-assemblées d'agents tensioactifs de faible masse molaire. Ces premiers systèmes avaient tendance à être très rapidement éliminés du corps en raison de l'échange lipidique rapide et de leur détection par le système réticulo-endothélial (RES) [22]. La deuxième génération de liposomes a été modifiée sur leur surface par le poly (éthylène glycol) (PEG ou PEO), celui-ci les rendant invisibles au RES, donc leur permettant d'avoir de longs temps de circulation dans le sang ($t_{1/2}$ de dizaines d'heures). Ces systèmes circulaient assez longtemps pour conduire à une meilleure accumulation dans la zone tumorale [23]. Cependant, dans certains cas, ils étaient trop stables et ne libéraient pas le médicament du tout [22]. Ceci n'a cependant pas été observé dans le cas des formulations liposomales de mTHPC dans des liposomes pégylés classiques et mis au point par Biolitec, ainsi appelés Foslip et Fospeg [24].

Un autre transporteur nanométrique à l'étude est basé sur des nanoparticules [25] de silice. Celles-ci ont l'avantage d'être chimiquement inertes, poreuses et ne gonflent pas avec le pH. Divers systèmes ont été étudiés, que ce soit simplement en piégeant le photosensibilisateur à l'intérieur de la nanoparticule ou en le greffant de façon covalente à la silice. Les résultats sont bons et présentent dans certains cas une plus forte génération d' 1O_2 en présence de la nanoparticule. Cependant, un inconvénient de ces supports est le fait qu'ils ne sont pas dégradables.

Des micelles ou d'autres systèmes d'encapsulation sont aussi utilisés pour les objets tout ceci dans le but de dépasser les différents problèmes de la PDT. Ainsi il a été montré pour ces objets là une très forte augmentation de l'effet PDT. L'explication proposée est que la génération d'oxygène singulet était augmentée par l'empêchement de l'effet de π -stacking comme dans les autres objets, mais la présence de PEG en extérieur des vecteurs donne aussi un grand intérêt biologique à ces vecteurs, en plus de leur versatilité, et du fait qu'ils sont souvent biodégradables.

e. Conclusion

La PDT est donc un système idéal dans bien des domaines, elle permet de cibler des tissus très spécifiques sans risques pour les tissus adjacents, limitant ainsi les dommages collatéraux très connus dans les cas de traitements de cancers. Comme nous l'avons évoqué, la lumière doit être choisie dans une certaine gamme de longueur d'onde. Cependant celle-ci ne peut pénétrer profondément dans les tissus, et malgré la possibilité de véhiculer la lumière par fibre optique, la PDT reste donc principalement applicable dans le domaine des cancers superficiels et de taille raisonnable. D'autres défauts freinent aussi son développement comme la réticence des chirurgiens à utiliser la méthode à cause de la nécessité d'adapter la puissance du traitement à chaque patient.

Comme discuté rapidement, la vectorisation des photosensibilisateurs peut limiter un certain nombre d'inconvénients de la technique, en particulier la biodisponibilité.

Nous utiliserons principalement le Phéophorbide-a (Figure I-4), une porphyrine classique de la PDT très proche de nombreuses formes utilisées commercialement. Cette porphyrine comporte, comme la plupart des agents non décorés, tous les problèmes de la PDT si ce n'est la possible cytotoxicité, elle sera donc vectorisée dans le but d'augmenter son efficacité comme cela a déjà été fait [26] dans notre équipe, amenant une augmentation de l'efficacité d'un facteur 10.

Cependant le but de cette thèse n'est pas particulièrement d'améliorer encore les micelles chargées en Phéo par J.Ehrhart mais plus d'utiliser le Phéo comme un modèle de médicament dans le but de travailler sur les vecteurs eux-mêmes.

Photodynamic therapy

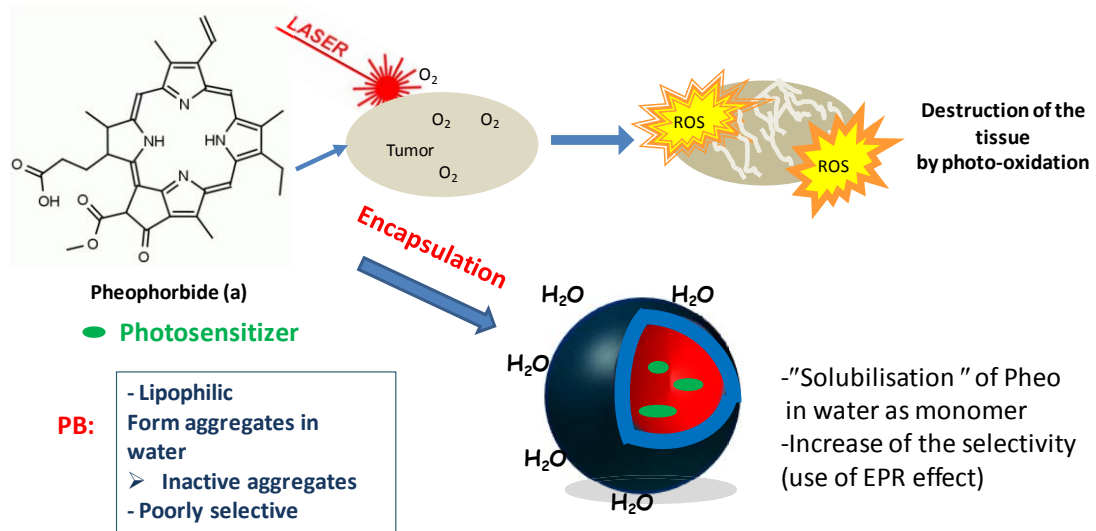


Figure I-4 : Résumé de la PDT et intérêt de la vectorisation

2. Objets auto-assemblés

a. Un domaine fortement utilisé pour la nanomédecine

La nano-médecine est un terme couramment utilisé qui décrit les applications des nano technologies dans le traitement médical. Il contient donc l'utilisation d'outils moléculaires à l'échelle nanométrique, des nano particules et nanovecteurs pour le diagnostic, le traitement ciblé ou plus généralement l'amélioration de la santé humaine.

Ces outils présentent des tailles très inférieures à la cellule et pourraient aussi bien traiter les cancers que les détecter plus rapidement ou avec plus de précision, avec moins d'effet secondaires, et peut être même atteindre les métastases à des stades précoces (comme celles en circulation).

Parmi tout le champ de la nanomédecine, le domaine qui nous intéresse plus particulièrement ici est celui des nanovecteurs de médicament. Parmi tous les modes d'administration, c'est la voie intra-veineuse qui est la plus étudiée et pour laquelle les nanovecteurs se sont avérés les plus enrichissants. La bibliographie présentée dans ce chapitre se limite donc à ce mode d'administration IV.

Un certain nombre de nano-objets a reçu l'approbation clinique pour la réduction de la toxicité des médicaments (Tableau I-1). Les buts sont donc de combiner un ciblage spécifique, une forte biocompatibilité, et ce, avec des produits de traitements pharmaceutiques déjà efficaces [27, 28].

Nom commercial	Cible	Principe actif	Système
Myocet[®]	Cancer du sein	Doxorubicine	Liposome
Abraxane	Cancer du sein	Paclitaxel	Complexe d'albumine
Doxil[®]	Cancer des ovaires	Doxorubicine	Liposome-PEG
Visudyne[®]	Rétine	Vertéporfine	Liposome
Caelyx[®]	Tumeur cutanée	Doxorubicine	Liposome-PEG
Genexol-PM[®]	Cancer sein et poumon	Paclitaxel	PLA-PEO Micelle
Oncaspar[®]	Leucémie, Lymphoblastie	L-asparginase	Complexe de forme micellaire

Tableau I-1 : Exemple de divers nano-objets approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) et par la EMA (Agence Européenne du Médicament) pour l'utilisation clinique en oncologie

Historiquement les vecteurs ont été utilisés afin de permettre le passage des barrières biologiques à des principes actifs intacts et en quantité maximale. En effet les principes actifs sont pour la plupart inaptes à franchir ces barrières, puisqu'étant hydrophobes ou chargé, donc facilement complexés en milieu biologique voire détruits. L'injection dans le corps est aussi suivie, pour la plupart des principes actifs, d'une dispersion dans tout l'organisme. Ceci ne permet pas d'atteindre une

concentration thérapeutique viable, et peut être toxique, ou au moins dommageable pour les cellules et organes non ciblés.

Les découvertes des liposomes en 1965 [29, 30] ou des nanoparticules ou des micelles de polymères à la fin des années 1970 [31] ont ouvert la voie au développement d'outils de transport plus adaptés [32].

Depuis ces années, de nombreux types de nano-objets ont été examinés et il y a maintenant l'embarras du choix pour transporter un principe actif vers sa cible.

b. Ciblage

Il existe deux grands types de ciblage pour les nano-objets dans le cadre des tumeurs cancéreuses, deux principaux moyens de mener ces objets vers leurs cibles [33-35].

Le premier et le plus simple à concevoir mais le plus complexe à développer est le ciblage actif. Il est basé sur la conjugaison de la nanoparticule avec une molécule à sa surface. Cette molécule est choisie pour pouvoir se lier à un récepteur de la cellule visée de façon spécifique et avec une très forte affinité dans le but que cette dernière l'internalise.

De fait, cette action augmente la capacité d'interaction des objets avec la cible et donc permet l'augmentation de la quantité de médicament dans la zone cible. Cependant ce mode de ciblage n'est pas facile à mettre en œuvre et nécessite la plupart du temps une chimie lourde.

Le second mode de ciblage est le ciblage passif principalement généré par l'effet EPR [36] (Enhanced permeability and retention), exploitant les mécanismes biologiques de la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses ont un taux de croissance nettement plus élevé que les cellules normales avoisinantes. Elles monopolisent donc les nutriments et l'oxygène et forment de petites colonies, souvent sous forme de sphéroïdes, qui grossissent rapidement. A la taille limite de diffusion (2mm [37, 38]) les tissus sains sont débordés par la tumeur et ne peuvent plus traiter les déchets ou concourir pour les nutriments. A l'inverse des cellules cancéreuses qui, elles, survivent et génèrent une forte angiogénèse, stimulant ainsi la vascularisation. Cependant les membranes basales ainsi formées dans le stress sont souvent anormales ce qui se traduit par une perméabilisation de ces vaisseaux aux objets de moins de 200nm environ mais pouvant aller jusqu'au micromètre. De plus le drainage lymphatique est mauvais et un différentiel de pression vers l'intérieur de la tumeur induit une diffusion des molécules [39]. Les vaisseaux sanguins dans la zone tumorale présentent donc des disjonctions intercellulaires qui peuvent laisser passer des nano-objets, et ceux-ci n'étant pas évacués par le système lymphatique déficient, on obtient une accumulation progressive des vecteurs dans la zone tumorale, comme l'a montré Hiroshi Maeda [40]. En contre partie, ils ne s'accumulent que peu dans les tissus sains qui ne possèdent pas ce défaut [41]. Par contre la taille optimale des nano-objets n'est pas clairement identifiée [42-44]. Il est accepté que cette dernière se situe entre 20 et 300nm mais dépend grandement des tumeurs ciblées.

Toutefois, il faut se méfier d'une vision trop simpliste de cet effet, et nombre d'études ont montré une limitation de celui-ci conduisant à une efficacité thérapeutique décevante. C'est pourquoi Etezadi et al. [45] ont proposé de développer la recherche autour de la notion d'effet Ultra-EPR (au sens de « au-delà »), résumée dans la figure Figure I-5. L'idée part du principe que pour obtenir une efficacité améliorée, d'autres paramètres doivent être inclus dans le design des vecteurs, ainsi que

dans leurs propriétés. Les mêmes concepts de base sont nécessaires, comme une longue circulation, une bonne stabilité du nano-objet (nano drug delivery system NDDS), une bonne rétention du médicament et la possibilité d'un ajout de ciblage actif. A cela, ils ajoutent l'importance de la taille [46] ainsi qu'une bonne connaissance des propriétés de surface [47][48]. Par exemple une faible charge négative ($\sim -10.6\text{mV}$) sur une surface de 30nm de PEG-PLA aurait tendance à réduire les concentrations non spécifiques telles que celles du foie ou du rein [49] et permettrait donc une diffusion prolongée. La performance biologique quant à elle ne se limite pas à l'accumulation par l'effet EPR, il importe de caractériser la pénétration au sein de la tumeur, la biodisponibilité du principe actif, et aussi et surtout de définir l'état « EPR » de la tumeur considérée. En effet, une source d'échec est la grande variabilité des différentes tumeurs et l'étendue de cet effet EPR. La classification de la tumeur sur une échelle de cet effet EPR permettrait donc de mieux prévoir les vecteurs utilisables. Ceci rejoint directement la notion de médecine personnalisée de plus en plus mentionnée en oncologie, un état des lieux des tumeurs devant être effectué pour chaque patient et pour chaque tumeur.

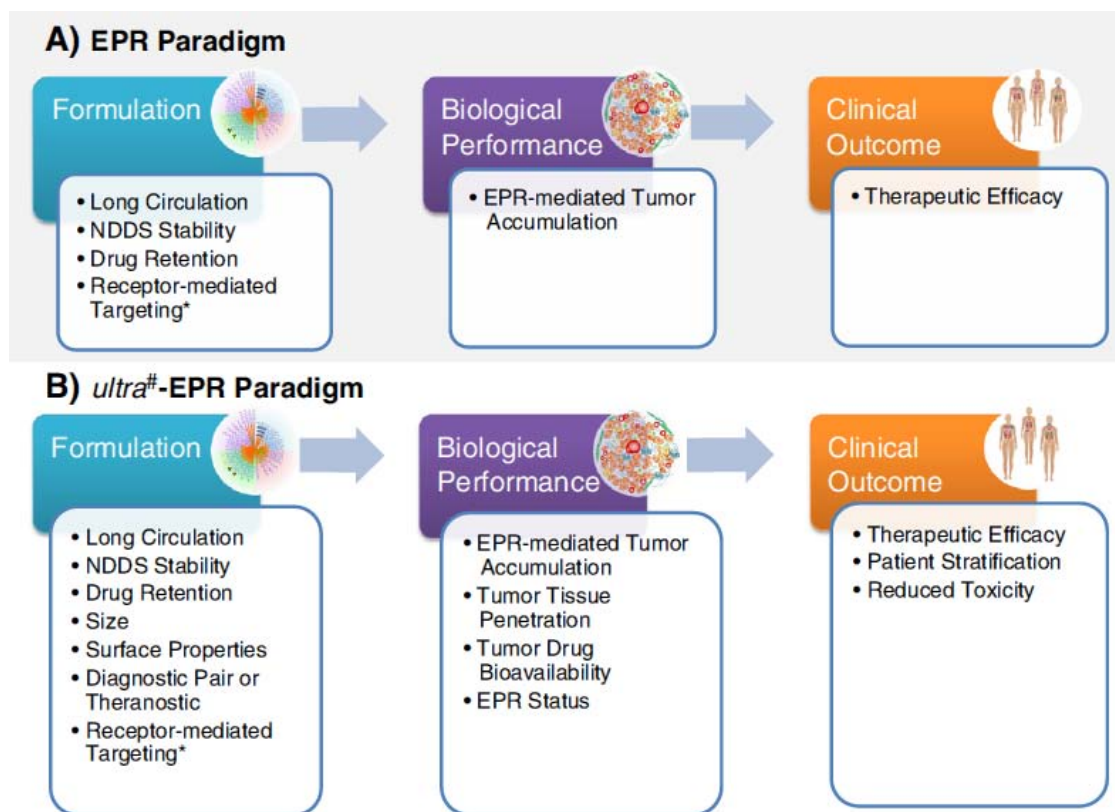


Figure I-5 : Proposition de Etezadi et al. vis-à-vis de l'effet EPR [45]

Ces paradigmes supposés permettraient donc d'aller beaucoup plus loin dans la définition d'un médicament géré par effet EPR, que ça soit dans la connaissance de l'effet EPR spécifique au patient, ce qui, du fait de la disparité des cancers n'est pas atteignable autrement, mais aussi dans la réduction de toxicité via cette plus faible absorption non spécifique et à la forte pénétration tumorale maîtrisée en grande partie par la taille [50-52] et possiblement par le ciblage actif.

En résumé, les deux types de ciblage peuvent être utilisés ensemble pour les objets, le ciblage passif permet aux objets d'atteindre des tumeurs en exploitant les défauts qu'elles occasionnent, le

second, actif, n'est pas limité aux tumeurs et peut servir à de nombreux autres objectifs mais est bien plus complexe à mettre en œuvre. De plus le ciblage actif, en plus d'être complexe à mettre en œuvre, est sujet à débat [53, 54]. En effet, pour beaucoup de ligands, une différence faible voire nulle entre les vecteurs à ciblage actif et passif a été observée [55, 56]

Il reste important de noter que le ciblage par effet EPR est souvent sujet à controverse car certaines tumeurs ne montrent pas d'effet EPR, ou pas d'effet EPR marqué [57]. Cependant cet effet reste l'un des plus utilisés car il est simple à mettre en œuvre et que de nombreuses tumeurs y sont sujettes.

c. Des nanovecteurs polymères

L'utilisation des nanovecteurs est mondialement étudiée et plusieurs critères sont nécessaires à l'obtention d'un vecteur idéal pour l'administration IV [58] :

- Les objets doivent être non toxiques et dégradables, ou au moins éliminables
- Les objets doivent transporter une quantité suffisante de principe actif
- La libération du principe actif doit être contrôlée dans le temps et l'espace
- Une surface modifiable chimique pour permettre le ciblage est appréciable car plus versatile
- Ils doivent avoir un temps de circulation permettant le relargage
- Ils ne doivent en aucun cas interférer avec le système immunitaire ou déclencher le système de complément sauf cas spécifique.

Afin d'optimiser le temps de circulation, il est essentiel que les nanovecteurs ne soient pas éliminés par la filtration rénale rapidement. Pour cela, leur taille ne doit pas être inférieure à 5nm [59]. A l'opposé, des particules trop grosses ou non protégées sont rapidement opsonisées et phagocytées, ne pouvant donc circuler longtemps [59, 60].

La furtivité vis-à-vis du système immunitaire étant importante dans la plupart des cas, le PEO est très souvent utilisé dans la couche hydrophile du vecteur. En effet, des études ont montré que sa présence rend le vecteur non détecté par les opsonines [61, 62] constituant la première étape de reconnaissance par le système immunitaire. Il faut toutefois mentionner que depuis quelques années, sa toute puissance est remise en question par la découverte que dans 10% des cas environ, une forme de résistance de l'organisme traité se met en place. En effet, lors d'une première injection, l'effet EPR est bien présent et le nanovecteur pégylé non détecté. Lors d'une deuxième injection, il arrive qu'aucun effet EPR ne se manifeste car le nanovecteur est très rapidement éliminé. Ce phénomène laisse supposer la formation d'anti-corps anti-PEG et pousse donc un certain nombre d'équipes à développer d'autres polymères en alternatives à celui-ci [63].

d. Les assemblages amphiphiles

Parmi les nombreux vecteurs existants, beaucoup sont créés à base de petites molécules ou de polymères amphiphiles.

La Figure I-6 présente un aperçu des différents systèmes étudiés:

- les micelles de polymères sont des objets entre ca. 10 et 50 nm et comportant une couronne hydrophile et un cœur hydrophobe [64]. Elles ont été longuement étudiées car elles sont très simples à mettre en œuvre [65, 66] et peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes [67]. Comme pour tous les autres vecteurs, on obtient ainsi une double protection, de l'organisme vis-à-vis des objets, et des objets vis à vis de l'organisme [68, 69].

- les dendrimères à structure fractale. Ces molécules sont plus complexes à réaliser chimiquement qu'un simple polymère puisqu'il faut avoir le contrôle de leur branchement [70, 71]. Cependant ils permettent une très forte interaction avec leur environnement grâce à un effet dendritique qui augmente la puissance des interactions des objets la rendant supérieure à celle de la somme des interactions de chaque chaîne prise séparément [72]. Cet effet a mené à de nombreuses études [73]. Ces objets sont donc utilisés en vectorisation, entre autres pour la transfection de l'ADN [74, 75].

- les nanosphères pleines ou encapsulant des gouttelettes [76]. Ce sont des objets normalement supérieurs à la centaine de nanomètres. Elles sont hautement stables du fait de leur nature solide [77] et peuvent être utilisées pour délivrer des anticancéreux [78, 79].

- les émulsions ou multi-émulsions [80] via des polymères ou petites molécules. Ces objets font entre 100nm et 10µm mais seules les microémulsions sont thermodynamiquement stables [81]. Elles sont utilisées dans le domaine de la vectorisation depuis très longtemps, principalement pour leur stabilité et leur grande capacité de chargement [82-84].

- les polymersomes ou vésicules polymères. Ce sont des objets présentant une gamme de taille très large, d'une centaine de nanomètres à la dizaine de microns. Comme les vésicules lipidiques ils sont formés d'une membrane hydrophobe entourée de deux zones hydrophiles [85, 86]. Ces objets sont très intéressants pour leur versatilité, ils peuvent aussi bien transporter des principes hydrophiles qu'hydrophobes [87].

- les gels, ou nano-gels. Ce sont des structures emplies d'eau qui ne se dissolvent pas [88]. Ils sont utilisés en vectorisation pour leur contenance en eau très importante et leur très forte biocompatibilité [89]. Ils sont depuis longtemps grandement étudiés comme de possibles vecteurs à long terme d'insuline pouvant ainsi, grâce à une sensibilité au sucre, remplacer les cellules d'un diabétique [90, 91].

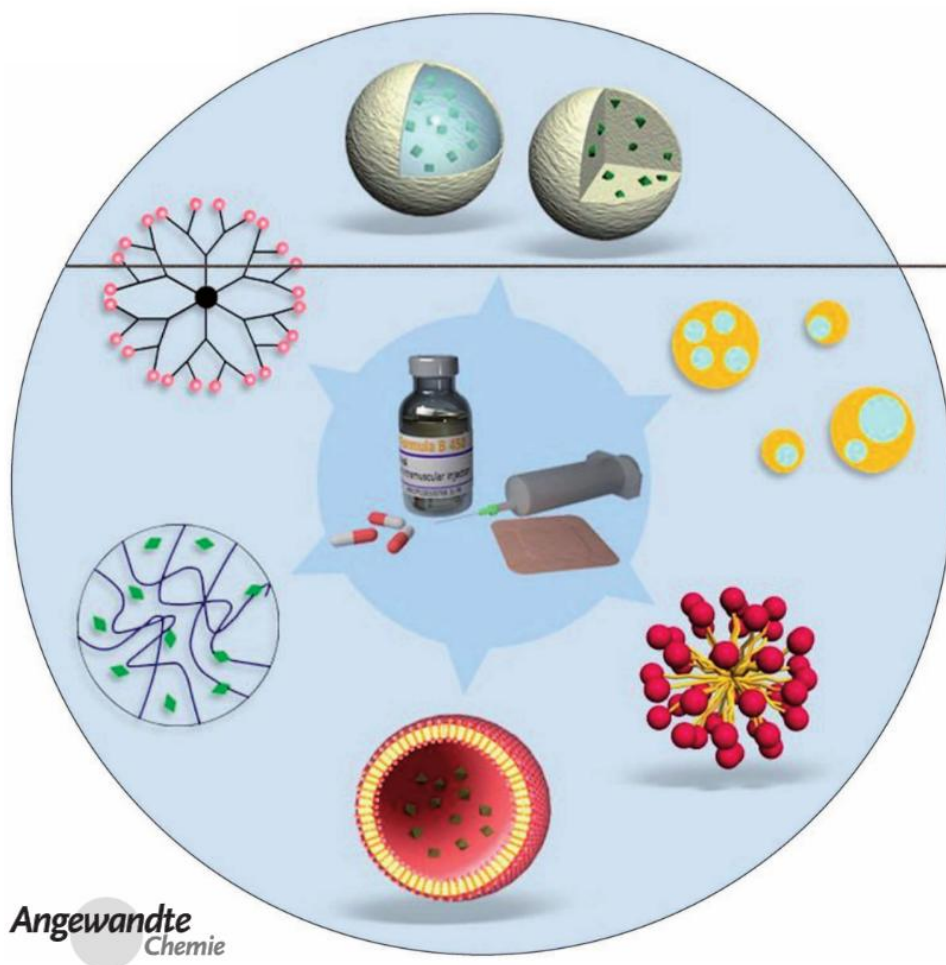


Figure I-6 : Différents nano-vecteurs auto assemblés [92]

Il manque aussi dans cette figure une partie importante du domaine des polymères comme matériel de délivrance de molécule active que sont les conjugués polymères-médicament . Une liaison chimique souvent clivable est formée entre le principe actif et le polymère qui va servir de cargo [93].

Parmi les auto-assemblages à base de polymères amphiphiles, nous en avons étudié deux, les micelles et les polymersomes.

e. Les assemblages poly-ioniques (PICs)

Les PICs ou assemblages Poly-ioniques sont des objets particulièrement complexes et fragiles. Ils sont créés par des interactions électrostatiques entre des chaînes polymères positives et une autre entité négative, souvent de l'ADN (Figure I-7) puisqu'étant une molécule d'intérêt. Cependant ils peuvent aussi être générés entre des chaînes de polymères négatives et positives [94] (Figure I-8).

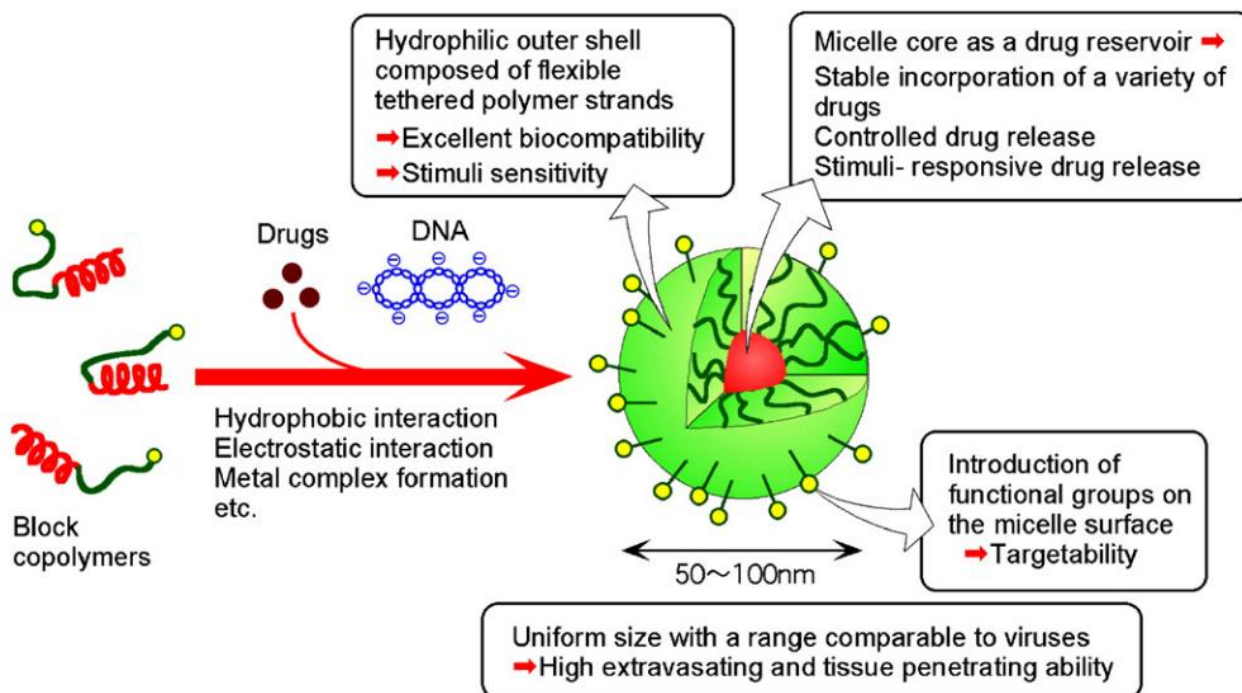


Figure I-7 : Premiers PICs avec l'ADN utilisé pour la transfection [95]

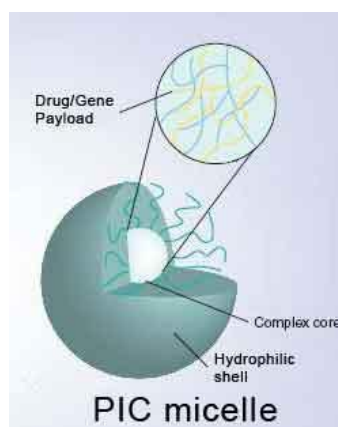


Figure I-8 : Micelle de PICs [94]

Les blocs hydrophiles neutres utilisés pour les PICs comprennent le poly (éthylèneglycol), des polyacrylates hydrophiles, polyacrylamides, polyoxazolines ou de la poly (vinylpyrrolidone) [96, 97]. Les blocs de polyélectrolytes utilisés sont usuellement des polypeptides, polyacrylates ou de l'ADN.

Par rapport aux nano-objets formés à partir de copolymères à blocs amphiphiles, les PICs présentent des similitudes en termes de gamme de taille (typiquement de 20 à quelques centaines de nanomètres) et des techniques pour leur caractérisation (diffusion dynamique ou statique de la lumière (DLS ou SLS) et microscopie électronique à transmission (TEM)). Des différences marquées existent cependant, la plus forte étant la sensibilité au sel. A la différence des assemblages decopolymères amphiphiles à blocs, les PICs présentent une stabilité très faible avec l'augmentation de la concentration en sel, en raison du déplacement des interactions électrostatiques. Ils ont été observés, par diffusion de lumière, se dissociant quand les concentrations de sel sont supérieures à 0,5 M. Dans le cas des polyampholytes faibles, ils sont également sensibles au pH [98] et l'auto-

assemblage n'est observé que pour une gamme de pH. Les PICs sont connus depuis plus de 50 ans [99], mais leur étude a fait l'objet de nouvelles stratégies, en raison de l'explosion des applications biologiques pour les nano-objets, en particulier dans le domaine de la nanomédecine.

Divers objets peuvent être vectorisés par des PICs. Pour cela, ils doivent être chargés et hydrophiles. Le groupe de Kataoka a, entre autres, formé des PICs avec des porphyrines dendritiques (DP) et des PEO-PLL (Poly-L-Lysine) [100] avec 38 DP par micelle dans le cœur en moyenne, ce qui en fait un très bon objet pour la PDT sans aucun quenching. Leur intérêt pour le traitement de la DMLA a été prouvé [101]. On trouve aussi d'autres objets sensibles au pH de par leurs charges acides [102] [103].

Mais les utilisations les plus courantes restent celles de la transfection et de la délivrance de gène ou d'ADN. Il a été montré que ces deux domaines sont extrêmement liés à la capacité de vectorisation [104, 105]. Ces objets nécessitent d'être couverts de PEG [106] pour ne pas être cationiques, ce qui pourrait mener à une forte toxicité.

f. Réticulation d'objet

Les auto-assemblages simples présentés ci-dessus ont le mérite d'être aisés à fabriquer. Toutefois, ils peuvent présenter dans certains cas une fragilité vis-à-vis des milieux biologiques, ce qui peut conduire au relargage prématuré du principe actif [107-111]. Pour limiter ce phénomène, la réticulation des vecteurs a été étudiée depuis une quinzaine d'années.

Plusieurs stratégies ont été évaluées, à savoir la réticulation de la coque, du cœur ou à l'interface entre les zones hydrophobes / hydrophiles [112, 113]. Même si le sujet a été étudié pendant plus de 15 ans, de nouveaux cas sont encore en cours de publication, avec des méthodes différentes de réticulation, telles que des réactions radicalaires [114-117], des formations de liaisons disulfures réversibles [118-124], ou des réactions de couplage [125-132]. Des approches originales ont utilisé des fragments uracyle [133], l'oxydation de la dopamine en présence d'air [115] ou la dimérisation réversible du cinnamate [134]. Des systèmes plus sophistiqués présentent une réticulation permettant la libération du médicament avec des conditions adéquates physiologiques (présence de dithiothréitol ou de glutathion, différence de pH) [135, 136]. Rajdev a montré que des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyles dans le poly (méthacrylate d'hydroxyéthyle) peuvent être utilisés comme réticulant supramoléculaire [137]. Le même concept pourrait être suggéré pour des micelles présentant une grande quantité de π -stacking [138].

En ce qui concerne l'efficacité thérapeutique, les systèmes réticulés amphiphiles sont le plus souvent testés *in vitro* sur culture cellulaire 2D. Cela conduit presque toujours à une baisse de l'activité du médicament par rapport à la forme libre ou encapsulée dans un vecteur non réticulé [115-117, 125]. Seuls quelques cas ont des activités de la même gamme ou supérieures [130, 138, 139].

Les PICs ont aussi été réticulés pour limiter leur fragilité aux milieux salins. Pour cela des thiols [140, 141], des amines [142], des imines [143] ou la chimie click [144] ont été utilisés.

g. Synthèse des Nano-objets polymères

La plupart des micelles de polymères et les polymersomes ne sont pas thermodynamiquement à l'équilibre mais figés cinétiquement lors de leur formation. Ainsi, la méthode de formation influe directement sur la morphologie et la taille des auto-assemblages obtenus. En revanche, une fois créés, ceux-ci n'évoluent pas dans le temps ou lentement malgré leur absence d'équilibre ce qui leur permet de résister à de très fortes dilutions.

Il existe plusieurs méthodes de formation couramment utilisées dans la littérature :

- L'addition de co-solvant [Annexe] consiste à introduire dans l'eau le polymère dans un solvant miscible à l'eau, la fuite de ce solvant permettant la formation des objets. Cette méthode peut être modifiée par l'utilisation de mélanges de solvant ou l'addition de petites molécules modifiant les coefficients de partage des entités [145]. De nombreuses méthodes de micro fluidique essayent d'améliorer encore cette voie.
- L'hydratation de film sec, éventuellement associée à une phase de sonication/extrusion, est la méthode de choix de fabrication des polymersomes [Annexe]. Elle vient de la fabrication de vésicules lipidiques et suit les mêmes idées. Comme pour les vésicules, le mécanisme exact de gonflement du film n'est pas encore parfaitement compris.
- L'électroformation est la troisième des méthodes utilisées, elle vient aussi des vésicules lipidiques et, comme cette dernière, n'est pas maîtrisée théoriquement. Cependant elle permet de faire des polymersomes géants, de taille supérieure au micron.

h. Conclusion

Il existe des dizaines de vecteurs possibles, et, même dans le domaine des vecteurs polymères, de nombreuses formes de vecteurs peuvent être utilisées pour la vectorisation. Ainsi, qu'il soit question d'une molécule hydrophobe ou hydrophile, le choix reste vaste dans le domaine des vecteurs utilisables.

Ce domaine, poussé par l'industrie pharmaceutique, est un sujet de recherche très important. Pour autant très peu des recherches arrivent à de véritables vecteurs utilisables par les médecins, il y a donc un réel intérêt de la communauté scientifique dans l'optique de mieux comprendre les effets autant biologiques que physico-chimiques qui lient les vecteurs à leur efficacité.

3. Caractérisations usuelles des nano-vecteurs polymères

Comme nous l'avons vu, un grand nombre d'architecture et de morphologies sont utilisables comme vecteurs polymères. La gamme de taille visée fait que, usuellement et de façon routinière, deux techniques d'analyse sont utilisées : la diffusion dynamique de la lumière (DLS), qui est souvent adjointe à une microscopie électronique à transmission (TEM).

La TEM ne sera pas abordée dans ce chapitre bibliographique car c'est une technique complexe qui induit facilement des erreurs mais qui est souvent réalisée par des techniciens ou ingénieurs spécialisés dans le domaine au vu de la technicité de l'objet.

La DLS à l'opposé est devenue une technique "Presse-bouton" grâce à la société Malvern qui a été très vite suivie par de nombreuses autres compagnies. Ce développement a produit une explosion des articles présentant des analyses DLS, éventuellement associées à des mesures de potentiels zeta. Nous avons donc décidé de prendre le temps de revenir sur ces deux techniques, en y associant la diffusion statique de la lumière.

a. Diffusions statique (SLS) et dynamique (DLS) de la lumière

La diffusion de la lumière est une technique d'analyse non destructrice, mise en place directement dans le milieu de l'objet et qui permet de mesurer des objets entre 1 et 500nm environ. Cette mesure se fait à l'aide d'un laser dont la lumière vient diffuser dans le milieu où les objets sont présents.

Ces techniques sont très utilisées pour calculer deux rayons, le rayon hydrodynamique et le rayon de giration notés respectivement R_h et R_g . Ces deux rayons sont représentés en Figure I-9 ainsi que R_m qui est le rayon équivalent pour une sphère parfaite de même masse et R_r qui est le rayon obtenu en faisant tourner l'objet sur lui-même.

R_g est donc un rayon défini comme la distance moyenne entre une extrémité de la chaîne et le centre de masse de la structure. R_h lui prend en compte l'hydratation et donc les interactions avec le solvant. De fait, dans le cas d'un vecteur amphiphile, les chaînes PEG formant la couronne des vecteurs ont une très forte influence dans le R_h et peu dans le R_g .

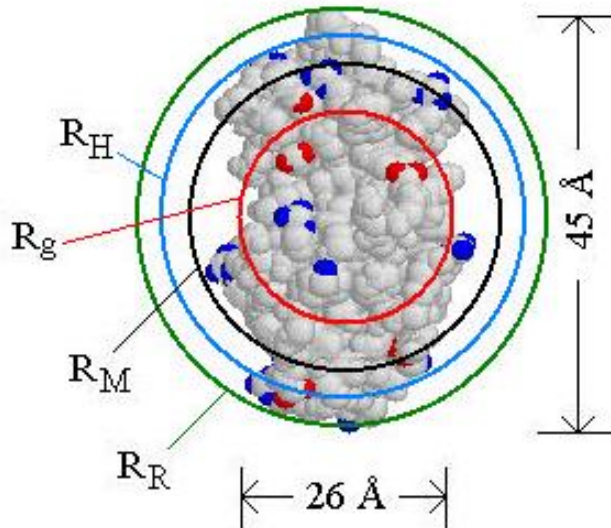


Figure I-9 : Différents rayons d'une protéine [Malvern]

Après interaction avec la matière, la lumière diffuse alors dans toutes les directions, l'étude de cette intensité diffusée en fonction des angles est la SLS, on observe donc :

$$\frac{KC}{R_\theta} = f(q^2)$$

Avec R_θ et q définis comme :

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{ et } R_\theta = \frac{I(\theta)n_0^2}{I_T(\theta)n_T^2} \frac{R_T}{N(\theta)}$$

Avec n_0 l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde du laser, et θ l'angle physique d'observation n l'indice de refraction soit du milieu soit du toluène, I l'intensité reçue soit dans le milieu soit dans le toluène, R_T une constante dépendant du laser, et K défini comme suit :

$$K = \frac{4\pi^2 n_{ref}^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 * N_a}$$

Avec N_a le nombre d'Avogadro.

Dans le cas de la diffusion de Rayleigh ($qR < 1$, $R < 100\text{nm}$), les caractéristiques de l'objet diffusant peuvent être extraites par l'équation :

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2 Rg^2}{3M_w \lambda^2} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)^2 + 2A_2 c$$

Avec M_w la masse molaire de l'objet diffusant et Rg son rayon de giration. A_2 quant à lui est un terme d'interaction appelé deuxième coefficient du viriel. $A_2 C$ variant avec la concentration, on utilise donc toujours une solution très diluée en SLS. De plus les variations de ce terme permettent de comprendre le comportement de l'objet avec la concentration. Ainsi comme le montre la Figure I-10, si $\frac{KC}{R_\theta}$ varie positivement avec la concentration, on a un phénomène d'agrégation et s'il varie négativement, c'est un phénomène de répulsion qui est en jeu. De plus il varie souvent à partir d'une certaine concentration C_1 à partir de laquelle les particules sont trop proches et commencent à interagir.

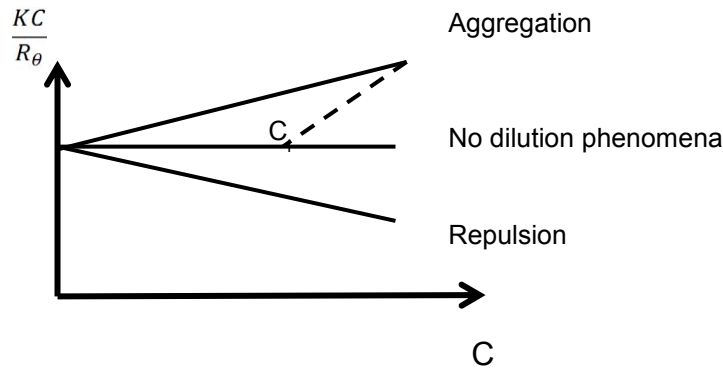


Figure I-10 : Evolution de $\frac{KC}{R_\theta}$ en fonction de C

Donc on a :

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2 Rg^2}{3}\right) + 2A_2 c$$

La SLS est aussi très intéressante car il est possible d'évaluer la forme des objets grâce à des modèles qui sont faits entre R_θ/KC et $\log(q)$ [1].

La DLS, quant à elle, utilise la mesure de la fluctuation dans le temps de l'intensité diffusée par ces objets à un seul angle, souvent 173°, pour éviter les phénomènes de diffusion/diffraction liés aux gros objets (Figure I-11, Figure I-12) [146]. Ces fluctuations sont liées au mouvement brownien de l'objet diffusant, et la mesure permet d'obtenir la fonction d'auto-corrélation associée, directement liée à la vitesse de diffusion de l'objet, donc de sa taille. Le corrélogramme peut ensuite être analysé par un grand nombre de méthodes qui ne seront pas détaillées ici [147].

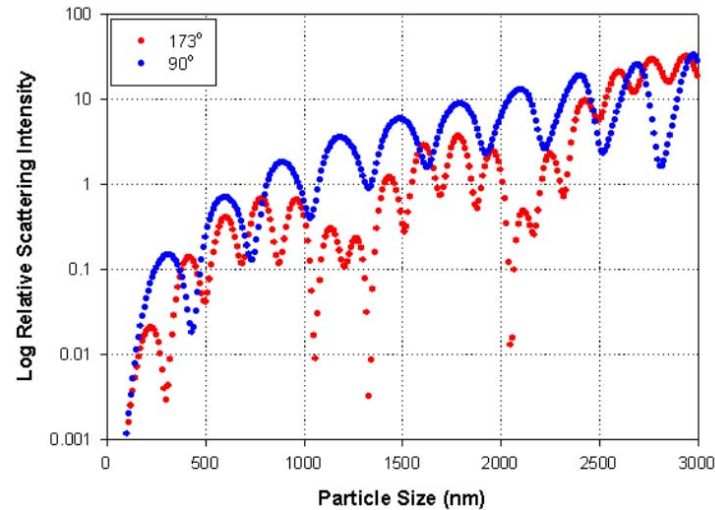


Figure I-11 : Effet de l'angle de détection et de la taille sur l'intensité diffusée [148]

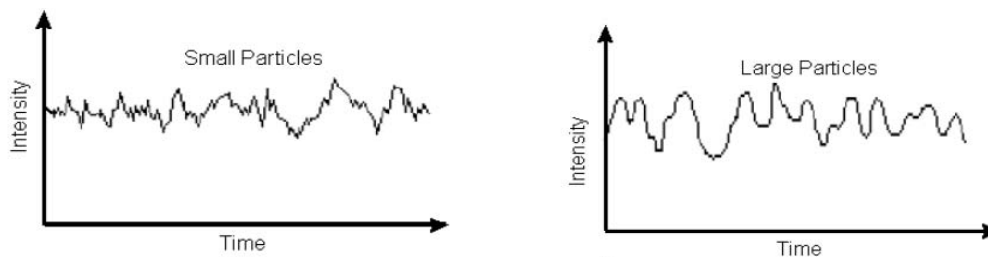


Figure I-12 : Intensité diffusée au cours du temps [148]

Cependant il est important de noter que l'équation qui lie le corrélogramme aux populations de nano-objets, quel qu'en soit le mode de résolution, a une infinité de solutions. Elle n'est théoriquement résoluble que par de nombreuses approximations. Ainsi de nombreux paramètres peuvent être modulés pour la résolution de l'équation et ce changement a tendance à donner des résultats plus ou moins différents [149].

On en sort donc le coefficient de diffusion dans le milieu de chaque population visible de particules et ainsi le R_h grâce à l'équation :

$$R_h = \frac{N_a T q^2}{6\pi\mu\Gamma}$$

Qui inclue la température, la viscosité du milieu, ainsi que Γ qui est le taux de décroissance de la fonction d'autocorrélation, égal à

$$\Gamma = q^2 D_t (1 + k_d C) (1 + f \langle Rg^2 \rangle_z q^2)$$

Avec k_d le second coefficient (de diffusion) du viriel qui représente les interactions entre les nanoparticules, f une valeur adimensionnelle dépendant de l'interaction objet-solvant, $\langle Rg^2 \rangle_z$ la moyenne sur z de Rg . Dans le cas simplifié où l'on considère que C et q sont très petits on a :

$$\Gamma = q^2 D_t$$

Avec D_t coefficient de diffusion.

La DLS est donc un outil intéressant mais qui prend en compte un certain nombre d'hypothèses :

- Les particules sont petites par rapport à la longueur d'onde (modèle de Rayleigh), sinon la théorie de Mie est utilisée.
- La source de lumière est monochromatique et cohérente.
- Le seul mouvement est dû au mouvement brownien (chaleur parfaitement uniforme dans la cuve, pas de gradient autre).
- Des hypothèses relatives à la forme des objets (micellaires, sphériques, core-shell ...).
- Un certain nombre d'hypothèses mathématiques (e.g. approximation de la diffusion (prise en compte ou non de la diffusion rotationnelle [150], mouvement de diffusion interne aux polymères [151], des formes) .
- Angle d'ouverture et d'analyse très faible [150, 152, 153].
- Diffusion unique, le proton ne diffuse qu'une seule fois ; pour la diffusion multiple, des corrections existent dans le cas de plusieurs angles de détections [154, 155] cela implique donc de travailler à faible concentration.
- $I_{\text{Soluté}} \gg I_{\text{Solvant}}$ [156], ce qui implique une concentration en objet diffusant assez élevée pour ne pas être dans le bruit.

Technique	Informations obtenues	Avantages	Inconvénients
SLS (MALS)	Mw, Rg, A ₂	Caractérisation poussée des objets Possibilité de modéliser le facteur de forme	Nécessité de faire des hypothèses Problème avec la Fluorescence Nécessite une forte attention à la corrélation (barre d'erreur)
DLS uni-angle	D et Rh	Méthode presse bouton - Facile d'utilisation - Formation rapide Utilisation rapide et faisable <i>in-situ</i> Très répandue Résultats en intensité et en nombre	Méthode presse bouton - Boite noire - Peu de recul Résultat malléable en fonction des méthodes utilisées Grande difficulté à l'analyse de multi-population dûe à la théorie ($I \propto R^6$) avec disparition des petits objets au profit des gros [149]
DLS multi-angle	D et Rh	Permet de décorréler les diffusions multiples Meilleure appréciation des objets multi-population	Difficile à prendre en main

Tableau I-2 : Avantages et Inconvénients des techniques de diffusion de la lumière

Comme le montre le Tableau I-2 il existe des avantages et des inconvénients à chaque méthode. Le premier de ces avantages est le fait que les techniques de diffusion de la lumière sont non destructrices et rapides d'utilisation. La SLS permet des caractérisations poussées des objets, et, grâce à des modélisations, d'avoir des idées de la forme de ces derniers. Cependant, même avec la présence de filtre, la fluorescence de certains objets va jusqu'à la rendre inutilisable dans certains cas.

La DLS quant à elle est un outil facile d'utilisation, plus encore que la SLS où une réflexion est demandée pour le fit. De plus la DLS à fibre optique étant développée et fiable des mesures sont faisables *in-situ*. Cependant cet outil boîte noire cache une théorie complexe qui n'est pas souvent prise en compte et demande un travail dans une gamme de concentration précise. Elle n'est finalement pas aussi "Presse-bouton" quand on prend la peine de s'y pencher..

La DLS multi-angle quant à elle perd l'avantage de la malléabilité et de la facilité d'installation de la DLS uni-angle mais permet une bien meilleure analyse. Elle permet en effet une décorrélation des phénomènes de diffusion multiple, et théoriquement une meilleure appréciation des multi-populations.

Quelle que soit la méthode, il est difficile de voir plusieurs populations correctement avec les techniques de diffusion, du fait que $I \propto R^6$, on perd donc facilement les petites populations dans le bruit de fond. Les techniques de diffusion doivent donc être complétées de techniques orthogonales.

b. Potentiel Zéta

Lorsqu'une particule chargée se déplace dans un liquide en présence de courants ou champs électriques externes, on parle du phénomène d'électrophorèse. La vitesse à laquelle se déplace cette particule (vitesse relative par rapport à la phase continue) est connue comme la vitesse

électrophorétique (V_e). De même on définit le rapport de l'amplitude de cette vitesse et l'amplitude du champ électrique comme la mobilité électrophorétique notée u_e ($m^2/V.s$).

Lorsqu'une particule se déplace, elle déplace solidairement de sa couche de Stern, qui est une double couche électrique : modèle décrivant la variation du potentiel électrique aux abords d'une surface. Elle vient de l'application aux nano-objets de la théorie de la double couche de Helmholtz. Et une partie de sa couche diffuse : ce sont les objets et ions qui bougent avec elle mais en ayant des interactions très faibles avec la nanoparticule et en échange constant avec le milieu.

Il existe alors un plan situé entre la couche de Stern et la couche diffuse qui marque une différence en terme de vitesse du fluide, ce plan est nommé plan de cisaillement. Le fluide compris entre la surface de la particule et ce plan de cisaillement possède une vitesse nulle (par rapport à la sphère). Ainsi, le déplacement et donc la vitesse de la particule seront liés à la viscosité, la constante diélectrique du fluide, et au potentiel électrique au niveau de ce plan de cisaillement.

Donc en mesurant cette vitesse il est théoriquement possible de mesurer le potentiel du plan de cisaillement. La valeur moyennée du potentiel au niveau de la surface du plan de cisaillement n'est autre que le potentiel zêta noté ζ et sert de substitut au potentiel de surface comme le montre la Figure I-13 et plus précisément la Figure I-14 quant à l'écart électrostatique [157].

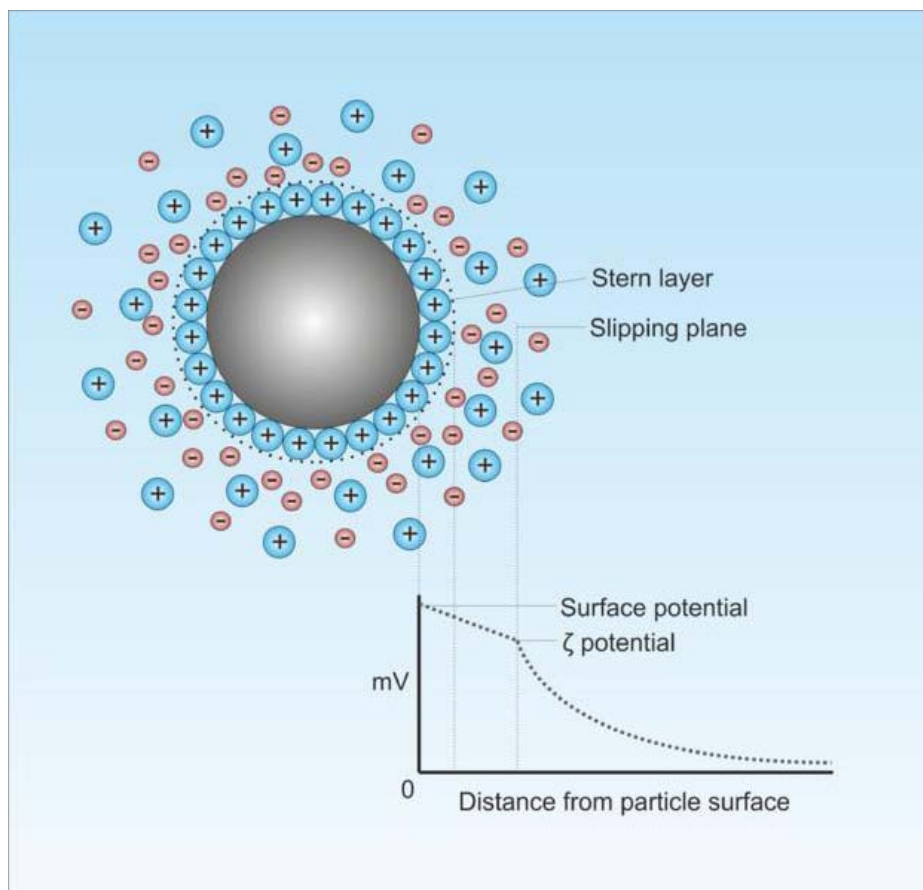


Figure I-13 : Modèle du potentiel Zéta [158, 159]

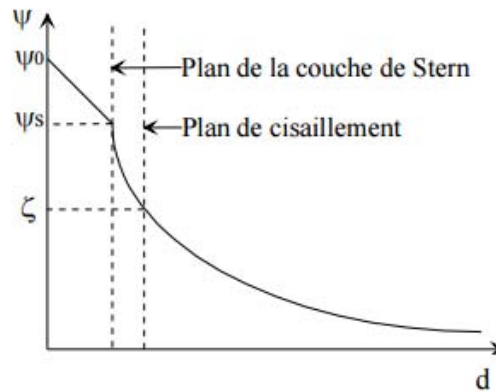


Figure I-14 : Variation du potentiel en fonction de la distance à la particule [158]

Ainsi théoriquement en mesurant la mobilité électrothermique, la viscosité du milieu, ainsi que la conductivité de celui-ci on peut atteindre la mesure du potentiel Zéta.

Sans entrer dans les détails, il est important de noter que la seule équation applicable à une large gamme de nanoparticules n'est pas en mesure de suivre des potentiels supérieurs à 25mV et ne prend pas en compte la déformation de la double couche, et donc le phénomène de relaxation [160], le problème venant du développement de l'équation vis-à-vis de la longueur de Debye*Rayon de la particule [161-163].

D'autre part, un autre point important est le fait que le potentiel zéta est toujours exprimé ou associé à deux paramètres clés : la force ionique et le pH. Le fait de faire varier la force ionique se traduit par un changement de la position du plan de cisaillement et donc de la valeur du potentiel zéta. En ce qui concerne le pH, celui-ci joue un rôle très important : quand celui-ci augmente, il y a un moment où la polarité de la charge de surface s'inverse de part et d'autre du point isoélectrique où le potentiel est nul. Ce comportement est valable pour la plupart des électrolytes [158, 164].

De plus, la mesure du potentiel Zéta impacte souvent la morphologie de l'objet, surtout dans le domaine des polymères. Elle considère que l'objet est indéformable (non seulement du point de vue de la double couche mais aussi de l'objet lui-même), et qu'aucune modification n'est induite par le courant. Or l'électrolyse de l'eau est courante au vu des potentiels appliqués (donc en plus de la perte de courant et une création de bulle, une déstructuration de l'objet est possible), et un suivi de l'objet au cours de l'analyse est nécessaire.

Il est difficile de concevoir une analyse parfaite d'un paramètre aussi complexe.

Ainsi si un potentiel Zéta est mesurable, il doit toujours être lié à la force ionique, au milieu utilisé, et au pH. Or dans le cas des vecteurs utilisés en nanomédecine, il est important de le mesurer en milieu de culture, ce qui, à cause de la présence de grosses protéines et des divers objets, semble très complexe dans des systèmes en batch. Pour cela, l'utilisation de l'Electrical Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation commercialisée depuis peu par Post-Nova et Wyatt paraît très prometteuse.

4. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AsFFFF)

Ces méthodes de Field Flow Fractionation ou fractionnement flux force (FFF) sont des méthodes de fractionnement permettant de séparer des objets ou analytes par un écoulement dans un canal en l'absence de phase stationnaire sous l'action d'un champ externe et pour lesquelles la théorie a été principalement explorée en profondeur depuis leur création en 1966.

a. Pourquoi les méthodes FFF ?

Parmi les dizaines de méthodes d'analyses existantes, les méthodes FFF ont de nombreux avantages :

- Les systèmes peuvent être fractionnés suivant différentes caractéristiques physicochimiques (exemple : taille et composition)
- Il n'y a pas de phase stationnaire donc pas d'interaction avec celle-ci [165]
- la force de cisaillement est minimisée [166-169]
- Des méthodes de séparation de 1nm à 100µm [167, 170]
- des analytes fragiles comme des agrégats de protéines, des assemblages supramoléculaires ou des cellules sont possibles [1, 26, 171, 172]
- Des conditions d'analyse sont facilement modifiables et programmables pour des échantillons différents.

b. La théorie du fractionnement flux force (FFF)

Fractionnement d'écoulement de champ ou fractionnement par couplage flux-force, voilà les deux noms français qu'on entend pour cette méthode méconnue mais prometteuse [173]. Cette théorie fut développée par le professeur Calvin Giddings en 1966 à l'université d'Utah, à Salt Lake City aux États-Unis [174, 175].

Toutes les FFF fonctionnent sur le même principe (Figure I-15). Un solvant est mis en mouvement dans un canal fin (100 à 600µm). Cet écoulement est laminaire c'est-à-dire que la vitesse est maximale au centre du canal et nulle aux parois. Perpendiculairement à cet écoulement, une force est appliquée. Cette dernière va conduire à un positionnement des analytes dans des vecteurs vitesses différents sur la base de critères physico-chimiques (taille, densité, charge...) et dépendant de la nature de la force appliquée (flux d'éluant, force centrifuge, champ électrique...).

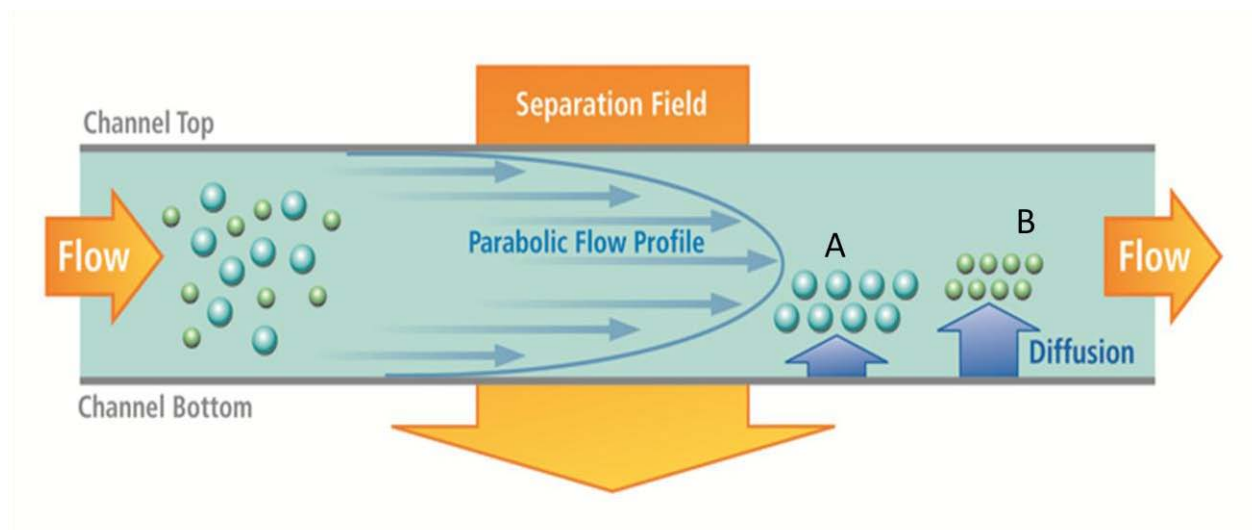


Figure I-15: schéma de principe de la FFF [Post-Nova]

La première étape du fractionnement flux force est normalement l'injection des échantillons à l'entrée du canal suivie de l'application du champ externe. L'effet du champ apporte le déplacement des constituants vers la paroi d'accumulation et ce à une vitesse déterminée par la force d'interaction champ-analyte. Cette vitesse se met en équilibre avec les autres forces en jeu (diffusion pour les petites molécules, proches de la paroi pour les plus imposantes) et dès que cet équilibre est trouvé, le flux laminaire est mis en place.

Le vecteur vitesse du flux étant plus faible près des parois, les analytes à proximité de celles-ci (ayant le plus interagi avec le champ)(Analyte A) se déplacent donc dans la cellule plus lentement. Ils prendront donc plus de temps à éluer et sortiront du canal après les analytes B.

Ce principe de base permet une séparation des molécules ou des objets qui sont alors détectés et analysés par différents types de détecteurs (UV, RI, DLS, SLS, MS...) et conduisent à l'obtention de fractogrammes.

c. Différentes FFF

Comme il existe différents champs possibles à appliquer de façon perpendiculaire au flux, il existe de nombreuses méthodes FFF. Ces dernières peuvent ainsi être choisies en fonction de l'analyte à caractériser.

Usuellement, ces différentes méthodes utilisent un paramètre de rétention (λ) différent, ce paramètre possède un grand intérêt car il définit physiquement la distance entre la zone d'accumulation et le centre de gravité de l'analyte relativement à l'épaisseur de la cellule.

Il est relatif à l'interaction de l'analyte avec les différentes forces exercées suivant la formule :

$$\lambda = \frac{kT}{wF}$$

Avec w l'épaisseur de la cellule et F la force perpendiculaire au flux exercé.

Enfin il peut de plus être utilisé pour trouver le temps de rétention (t_r) ou les différences avec celui-ci et suit la formule simplifiée pour λ petit :

$$\frac{t_r}{t_0} = 6\lambda$$

C'est donc un pont très intéressant entre la théorie et la pratique et un moyen de comparaison des différentes techniques FFF.

Ces paramètres sont comparés dans le Tableau I-3 accompagnés des paramètres contrôlant la rétention et ainsi permettant le choix de la technique FFF en fonction de l'analyse souhaitée. Il faut cependant tenir compte des paramètres techniques, la SdFFF par exemple ne peut avoir une vitesse de rotation permettant de caractériser des objets peu denses ...

Méthode	Paramètre λ	Paramètre contrôlant la rétention
SdFFF (Sédimentation)	$\lambda = \frac{kT}{m_{eff}Gw}$	m_{eff}
FIFFF (Flux)	$\lambda = \frac{kTV^0}{3\pi\eta V_c w^2 d_{St}}$	d_{St}
ThFFF (Thermique)	$\lambda = \frac{1}{\left(\frac{D_T}{D} + \gamma\right) \frac{dT}{dx} w}$	$s = \frac{D_T}{D}$
EIFFF (Electrique)	$\lambda = \frac{D}{\mu E w}$	$\frac{\mu}{D}$

d_{St} = Diametre de Stokes $\sim 2Rh$
 D = Coefficient de diffusion massique
 D_T = Coefficient de diffusion thermique
 m_{eff} = masse effective
 s = Coefficient de Soret
 μ = Mobilité électrophorétique

$\frac{dT}{dx}$ = Gradient de température
 E = Champ électrique
 G = Gravitation/ Accélération centrifuge
 k = Constante de Boltzmann
 T = Température absolue (K)

V_c = Vitesse du Crossflow
 w = Epaisseur de la cellule
 γ = Coefficient d'expansion thermique de l'éluent
 η = Viscosité de l'éluent
 V^0 = Volume de la cellule

Tableau I-3: Différentes FFF et paramètres en mode Brownien (Classique pour des particules de petite taille)

Nous pouvons donc sélectionner une méthode en fonction du choix de l'objet que nous voulons analyser et des paramètres qui nous importent le plus :

Ainsi par exemple la sédimentation FFF (SdFFF) permet de sélectionner suivant la masse effective soit $\pi d^3 |\rho_{objet} - \rho_{eluent}|$. Cette méthode est donc très intéressante entre autre pour l'analyse de cellules souches [176], ou l'analyse de nano particules telles que l'or ou le polystyrène. Elle permet de vérifier l'absence de médicament libre [177]. Elle surpasse même très facilement la DLS pour ce qui est de la caractérisation des agrégats par la théorie [178-180].

Dans notre cas, $|\rho_{objet} - \rho_{eluent}|$ étant proche de zéro, cette méthode n'a pas d'intérêt pour la caractérisation d'assemblages.

La ThFFF par diffusion thermique a permis quant à elle de très bonnes analyses et des connaissances de micelles qui n'auraient pas été accessibles autrement. On peut citer ainsi la mise en évidence de différence entre des polybutadiènes 1-2 et de 1-4 [181], entre des polymères syndio et isotactique ou l'obtention de paramètre de Flory [182-184]. Cependant ces analyses en plus d'être complexes à effectuer sont encore très peu maîtrisées dans l'eau (du fait de problème de corrosion (solution souvent saline) et de faibles coefficients de diffusion thermique), solvant de prédilection pour les vecteurs à but thérapeutique.

L'Electrical FFF (EIFFF) est très intéressante quand les analystes présentent un potentiel zêta non nul. Fonctionnant sur la mobilité électrostatique, elle garde un certain nombre d'approximations qui sont faites dans les analyses de potentiels zêta classiques mais le travail sous les champs dans la cellule permet d'en réduire le nombre et serait de fait un très bon outil d'analyse de la mobilité électrostatique et donc de la charge superficielle des nano-objets [185-187].

Enfin le cas du FIFFF est un cas très intéressant, très malléable de par la grande influence de la taille de la cellule ainsi que le flux croisé qui se change facilement, il caractérise les objets en fonction de leur rayon de stokes, rayon hydrodynamique dans ce cas là. Or il est bien connu que ce rayon a une très forte importance dans la capacité de délivrance des nano-objets.

Cette dernière méthode est celle que nous avons choisie et dont l'utilisation s'est le plus répandue [1, 165, 173, 188-192].

d. Les cas du (Sy)FIFFF et de l'AsFIFFF

La flow FFF est donc une des « sous » techniques de la FFF ; elle se divise à son tour principalement en deux sous techniques, la FIFFF Symétrique et la FIFFF Asymétrique que M.H. Moon appelle respectivement “with stopflow relaxation” et “with focus relaxation”. Comme pour les méthodes FFF, le schéma de base ne varie pas (Figure I-16): le flux reste linéaire et parabolique, dans une cellule en forme d'hexagone allongé [193, 194].

Le flux, dans cette analyse là, sera donc un flux de liquide, le même éluant que celui qui est utilisé horizontalement, avec une vitesse V_c (comme évoqué dans le Tableau I-3 appelé souvent cross-flow ou flux croisé).

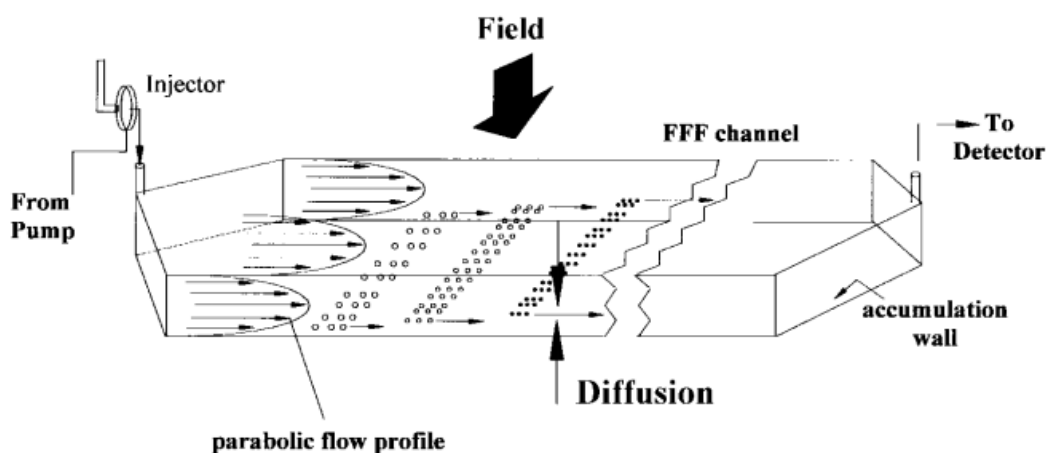


Figure I-16 : Schéma de FFF appliqué à une cellule de FIFFF [193]

Le mur d'accumulation inférieur quant à lui sera constitué d'une membrane souvent en cellulose régénérée, usuellement entre 1 et 20 kDa, une membrane à plus grand seuil de coupure permettant de réduire la pression dans la cellule et donc de pouvoir utiliser des flux plus importants.

La technique de FIFFF se régle donc par le flux linéaire V_x , le flux d'injection V_{inj} , le flux croisé directement visible dans λ , V_c , et l'épaisseur de la cellule. Tous ces paramètres font de la FIFFF une méthode versatile pouvant analyser des objets entre 1 nm et 50 μm , qu'il s'agisse de nanoparticules, de colloïdes, de protéines ou encore de polymères [195-197].

La méthode de SyFIFFF conventionnelle possède sur la partie supérieure comme sur la partie inférieure un fritt de céramique par lequel va passer le flux croisé. On a de plus le flux V_c entrant qui est égal au flux V_c sortant [198, 199] (Figure I-17 a).

Plus tard la méthode a évolué pour remplacer le fritt supérieur par un bloc imperméable [194]. De là est né l'Asymmetrical FIFFF (AsFIFFF) [200] (Figure I-17 b). Dans ce cas, le flux croisé est généré par la partie pompée à travers la membrane inférieure du flux et non par un flux venant réellement du dessus, ainsi il va être inégal sur la longueur de la cellule.

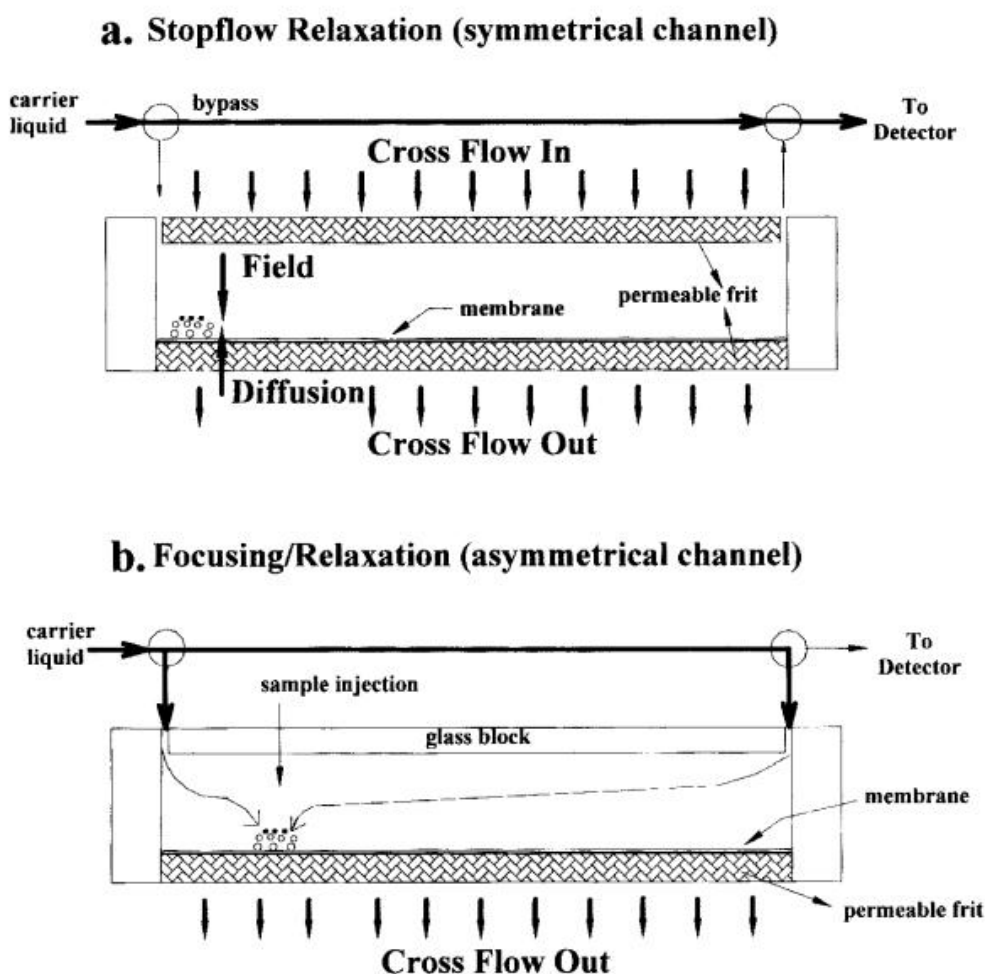


Figure I-17 : Schéma du SyFIFFF et du AsFIFFF [193]

Les deux méthodes s'opposent par bien des points, par exemple la création d'un stopflow pour la mise en place de l'équilibre au moment du focus. On court-circuite ainsi la cellule pour l'alimenter par le dessus et tirer par le dessous créant un pic souvent marqué à la reprise du flux par la cellule [199]. Cette organisation des flux permet cependant la relaxation des analytes.

Cependant il a aussi été montré que l'injection de l'AsFIFFF permettait une meilleure résolution sur les temps courts [200, 201], ainsi qu'une plus faible dilution de l'échantillon [201] impliquant pour la plupart des objets un meilleur taux de recouvrement.

e. Le cas du Frit inlet

Le Frit-inlet FIFFF ou FI-FIFFF est une troisième FIFFF moins utilisée que les précédentes car elle n'est commercialisée que depuis peu de temps, mais aussi car elle est moins versatile que les deux autres et possède plus de contraintes. Elle a été développée pour permettre d'analyser des protéines ou agrégats encore plus sensibles aux flux et principalement à l'étape de focus.

Le FI-FIFFF est décrit dans la Figure I-18, il vient se comporter comme un AsFIFFF classique mais un premier frité de quelques centimètres de longueur est positionné juste après l'injection dans la cellule. Ce frité sert à faire entrer un flux V_f (frit ou focus) qui va permettre de la relaxation hydrodynamique, autrement dit l'étape de focus et d'équilibrage des forces, à l'intérieur de la cellule et sans couper les flux ou les changer.

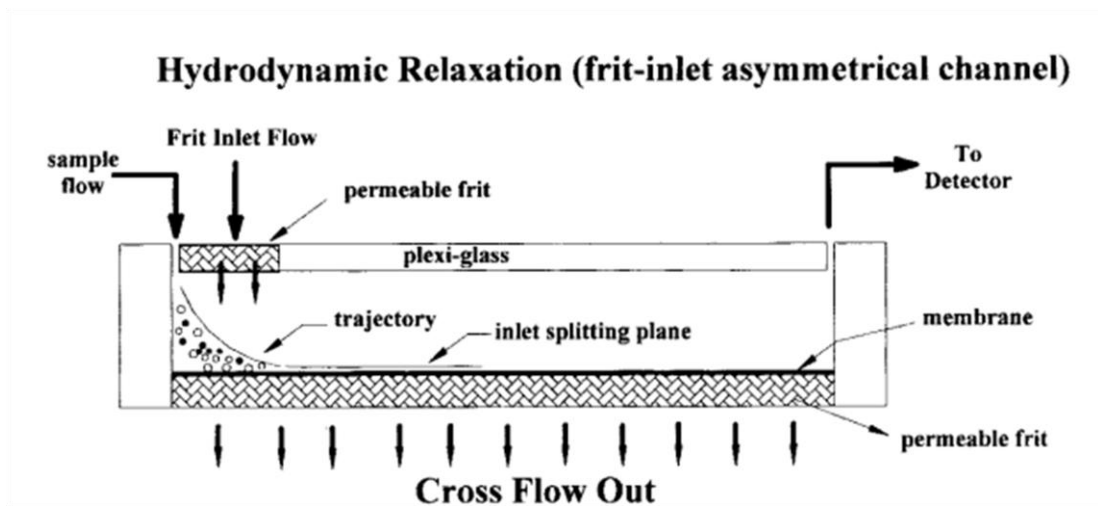


Figure I-18 : schéma du FI-FfFFF [193]

Ceci permet donc en premier lieu d'injecter rapidement comme dans une colonne de chromatographie, d'analyser sur des temps plus courts sans étape de focus, de réduire le pic d'injection, et donc d'avoir une meilleure ligne de base [193, 202, 203].

Pour ce faire, il faut que l'Équation I-1 soit satisfaite quoi qu'il arrive. Cette équation a été vérifiée pour de l'albumine de bœuf (BSA) et de la Tyroglobuline [202]. Il arrive que le ratio $\frac{V_f}{V_{inj}}$ doive être plus grand que 5. Usuellement la valeur recherchée est aux alentours de 10 voire 20 selon M.H Moon [193] pour atteindre une bonne relaxation hydrodynamique complète de l'échantillon.

$$5 < \frac{V_f}{V_{inj}} < 20$$

Équation I-1 : Nécessité pour la relaxation hydrodynamique

A comparer des autres techniques de FFF, le frit-inlet est une méthode très douce ayant permis l'analyse de composés très sensibles [203-207] tels que des protéines agrégées, des macromolécules ou des nanoparticules.

Malgré ces avantages il est bien moins utilisé et donc bien moins présent dans la littérature que les autres méthodes FFF.

f. Conclusion

Les méthodes FFF sont toutes des méthodes complètes permettant de parfaire les informations obtenues par les méthodes usuelles d'analyse des nano-objets en apportant un grand nombre de renseignements et en ayant une versatilité agréable.

Cependant, et à cause de cette variabilité qui leur permet de couvrir un si grand domaine, elles ne sont pas aisées à prendre en main.

Mais comme l'a souligné Zattoni et la FDA [173], une méthode classique et universelle de caractérisation des nano-objets est nécessaire, or nous savons déjà que la DLS classiquement utilisée est limitée. Les méthodes FFF, principalement FIFFF et SdFFF couplées à un MALS-RI, sont des méthodes avec un avenir prometteur pouvant possiblement couvrir cette demande.

5. Biologie et modèles de culture

a. Le cas des cancers

En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers en France métropolitaine était estimé à 365 000 (205 000 chez l'homme et 160 000 chez la femme), les taux standardisés d'incidence (population mondiale) sont de 362,6 pour 100 000 personnes par année chez l'homme et 252,0 chez la femme. Le nombre de décès par cancer en France était estimé à 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme, soit au total 147 800 décès et des taux standardisés respectivement de 133,6 et 73,2 pour 100 000 personnes par année (Tableau I-4).

En termes de mortalité, le cancer du poumon se situe au 1er rang chez l'homme (21 300 décès estimés en 2012) devant le cancer colorectal (9 200 décès) et le cancer de la prostate (8 900 décès).

Le nombre de nouveaux cas de cancers a considérablement augmenté entre 1980 et 2012 chez l'homme comme chez la femme (respectivement +107,6 % et +111,4 %). Cette hausse est en partie due à l'augmentation et au vieillissement de la population, mais aussi au dépistage qui a augmenté, la majorité des cas survenant chez les sujets âgés. Chez l'homme, cette augmentation se décompose ainsi : 30,8 % sont attribués à l'accroissement de la population, 33,7 % à son vieillissement et 43,1 % à l'augmentation du risque lui-même. Chez la femme, ces chiffres sont respectivement de 33,8 %, 22,5 % et 55,1 %. [208].

Et ces taux et risques ne cessent d'augmenter, c'est donc très couramment que le cancer est classifié par les états comme une cause nationale et que de nombreuses recherches sont faites pour tenter d'y remédier. C'est même selon l'OMS l'une des principales causes de mortalité par maladie dans le monde.

Localisations	Incidence			Mortalité		
	Effectifs*	Contribution à l'ensemble des cancers	Rang	Effectifs*	Contribution à l'ensemble des cancers	Rang
Prostate	71 000	19,4	1	8 700	5,9	4
Sein	53 000	14,9	2	11 500	7,8	3
Côlon-rectum	40 500	11,1	3	17 500	11,9	2
Poumon	39 500	10,8	4	29 100	19,7	1
VADS	13 930	3,8	5	4 230	2,9	7
Lymphome malin non hodgkinien	11 700	3,2	6	3 670	2,5	9
Rein	11 080	3,0	8	3 840	2,6	8
Vessie	10 980	3,0	7	4 670	3,2	6
Mélanome de la peau	9 780	2,7	9	1 620	1,1	17
Pancréas	9 040	2,5	10	8500	5,7	5
Tous cancers	365 500	100,0	-	147 500	100,0	-

*effectif total non arrondi

Tableau I-4 : Incidence et mortalité des cancers en France tous sexes confondus en 2011 (d'après l'Institut de Veille Sanitaire)

Malgré les efforts de recherche dans le domaine de l'oncologie, les résultats restent parfois décevants, la raison principale étant l'énorme diversité de types de cancers existants. Des différences sont même retrouvées entre les cas cliniques d'un même type de cancer [209]. De nombreuses études comme celle de Good et alii [210-212] cherchent donc à prédire la croissance du cancer à partir de données primaires telles que des images.

Parmi les types de cancers, nous avons opté pour deux des cinq cancers les plus courants (en France Figure I-20) et déjà traités par PDT en milieu hospitalier, soit le cancer colorectal, 3^{ème} cancer en nombre de cas, deuxième en nombre de morts, et le second étant un cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS), appelé plus couramment cancer de la tête et du cou. Associé au choix de type de cancer, il s'agissait ensuite de définir les lignées cellulaires.

b. Différentes lignées cellulaires

Il existe des milliers de lignées cellulaires exploitables en laboratoire. Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division.

Il s'agit en général de cellules cancéreuses prélevées chez un patient (comme les cellules HeLa), transformées artificiellement par un oncogène (un gène immortalisant) ou encore mutées par des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (comme la protéine p53).

Les lignées cellulaires dites non cancéreuses partagent avec les cellules cancéreuses de nombreux points :

- Leur indépendance vis-à-vis des signaux qui régulent (favorisent ou freinent) habituellement leur croissance et leur division,
- Leur capacité à échapper au processus de mort cellulaire programmée,
- Leur capacité à se diviser indéfiniment.

Cependant, la plupart des lignées cellulaires sont issues de lignées cancéreuses et de tumeurs. Comme il en existe un nombre conséquent, il est important de faire des choix parmi celles-ci. Le premier est de travailler sur le modèle humain, les cellules que nous utiliserons sont donc toutes humaines. Le second est de travailler sur des cellules qui peuvent être employées dans la création de sphéroïdes car c'est un des modèles 3D qui correspond le mieux à notre cas. Or il n'existe qu'une partie des lignées qui peuvent être facilement employées ainsi, une succincte synthèse de ces derniers est faite dans le Tableau I-5.

Tumeur	Lignée cellulaire	Diamètre maximum du sphéroïde (µm)	Fournisseur
Colon	DLD-1	750-850	ATCC
	HCC2998	600-700	NCI
	HCT-15	500-600	ATCC
	HCT-116	> 1 000	ATCC
	HT-29	> 1 000	ATCC
	KM12L4A	> 1 000	NCI
	KM20L2	> 1 000	NCI
Sein	BT549	Taille de formation*	ATCC
	Hs578T	Taille de formation	ATCC
	MCF-7	Grappe irrégulière	ATCC
	T47D	850-950	ATCC
Ovaire	OVCAR-8	800-900	NCI
	SKOV3	600-700	NCI
Prostate	DU-145	Taille de formation	ATCC
Rein	786-0	Taille de formation	NCI
	CaKi-1	750-850	ATCC
	SN12C	900-1 000	NCI
	SN12K1	Grappe irrégulière	NCI
	UO-31	Taille de formation	NCI
Poumon	A549	~ 1 000	ATCC
	HOP-62	Taille de formation	NCI
	NCI-H23	> 1 000	ATCC
	NCI-H226	Taille de formation	ATCC
	NCI-H226	800-900	ATCC
Tête et cou	FaDu (HTB-43)	300-600	ATCC

Tableau I-5 : Exemples de lignées cellulaires humaines courantes pouvant croître sous la forme de sphéroïdes [213-215]

**Taille de formation = Signifie que la taille du Sphéroïde n'évolue pas avec le temps*

Compte tenu de l'objectif de ce travail, les lignées choisies devaient former des sphéroïdes bien définis, et mimer des tumeurs en lien avec la PDT. Deux lignées étaient couramment utilisées par nos deux équipes des IMRCP et de l'IPBS, à savoir les HCT-116 [216, 217] et les MCF-7. Les MCF-7 ont rapidement été éliminées à cause des sphéroïdes formés non uniformes (Figure I-19). La lignée FaDu a été choisie en complément des HCT116 afin d'élargir l'étude à un cancer typiquement soignable par

PDT. Elle présentait de plus l'avantage de comportements cellulaires différents (temps de croissance, réponse au stress).

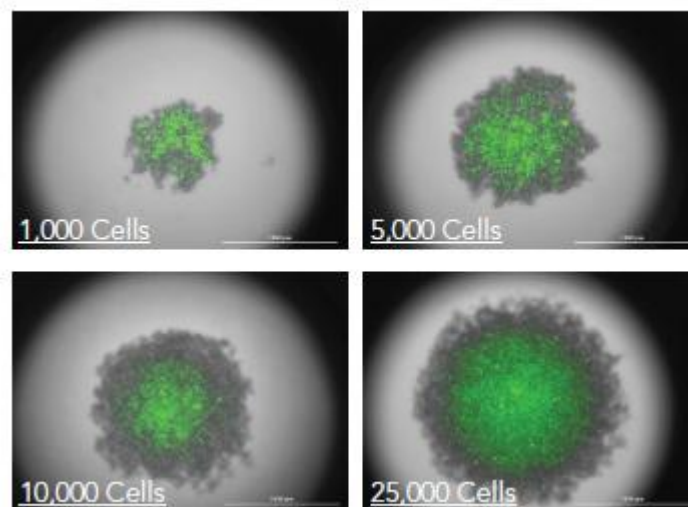


Figure I-19 : Sphéroïde de MCF-7 par goutte pendante en fluorescence coloré à GFP [218]

c. De la 2D à la 3D et choix du modèle

La culture cellulaire en deux dimensions reste largement prédominante dans les études de biologie menées dans le cadre de développement de nanovecteurs. Pourtant, les surfaces rigides et plates sur lesquelles adhèrent les cellules sont loin de représenter l'environnement cellulaire trouvé dans un organisme multicellulaire, et ces modèles ne permettent pas de prendre en compte l'architecture tissulaire, ni les régulations biochimiques, ni la communication cellule-cellule et cellule-matrice ni même la diffusion intra et inter cellulaire, très importante dans le cadre de vectorisation.

De nombreuses différences sont donc à noter entre le modèle 2D et les modèles 3D, dont les propriétés sont résumées dans le Tableau I-6. L'un des premiers points importants est par exemple l'impossibilité de stroma (réseau conjonctif) sur les cultures 2D qui dans une tumeur du cancer comme celle du sein compte pour plus de 80% du tissu [219]. On peut aussi parler de l'absence totale d'architecture ou leur plasticité exacerbée [220, 221] ou du fait que toutes les cellules (cancers du sang comme premier exemple) ne sont pas capables de croître sur une surface créée.

En opposition, les modèles 3D permettent de passer outre ces problèmes et peuvent même mener à une culture multicellulaire (donnant accès à d'autres informations telles que les interactions entre les cellules ou leur répartition dans le model [222, 223]), à des interactions cellule-cellule et à l'étude de leurs signaux intrinsèques. On sait de plus que les IC 50 des systèmes 3D sont couramment plus élevés que ceux des systèmes 2D [224].

Enfin l'un des points les plus importants dans le cadre des nano-objets reste la diffusion des nano-objets dans les sphéroïdes. De nombreuses publications ont traité de ce cas [225, 226] et toutes mettent en avant l'importance de la culture 3D que ce soit pour les protéines ou pour les nano-objets.

Modèle 2D	Modèle 3D
Facilité, prix	Savoir faire nécessaire
Accessibilité des kits d'analyses	Interaction matricielle (milieu) et cellule-cellule
Très bonne couverture de littérature	Possibilité d'hétérogénéité cellulaire
Tend à donner des résultats incomplets, voire surévalués	Nombreux phénomènes de diffusion du milieu et des objets
Comportement anormal des cellules (particulièrement mécaniquement)	Modélisation plus complète : <ul style="list-style-type: none"> • stroma possible • Nécrose interne • Géométrie bien définie

Tableau I-6 : Comparaison 2D-3D [226]

De nombreux modèles de culture cellulaire 3D ont été développés dans le but de se placer entre la culture classique insuffisante en information et l'expérimentation animale qui soulève de nombreuses questions d'éthique et subit une réglementation de plus en plus complexe [213, 227]. Ceux-ci sont résumés dans le Tableau I-7.

Système 3D	Avantages	Inconvénients	Matériel	Références
Sphéroïde	Facile et rapide à produire. Facile à imager, idéal pour suivre les nano-objets	Limitation de taille. Peu d'interaction matricielle. Hétérogénéité en fonction des lignées. Possible "uptake" de nano-objet irréaliste.	Plaques spéciales, Lignées adéquates	[228-236]
« Scaffold »	Grande taille. Propriétés physique, biochimique et mécanique adaptables. Facilité de suivi des nano-objets. Commercial	Nombreuses étapes. Variation entre individus. Dégradation Difficulté d'image et manipulation	Polymères nano/microstructurés	[229, 237-243]
"Organ on chip"	Contrôle précis de l'environnement, analyse en temps réel et facilité d'image. Variation intra-individuelle faible	Coût, connaissance et technique complexe. Réplication de la matrice limitée	Microfluidique	[244-246]
Culture Organotypique Organoïdes	Proche de l'organe réel, réaliste anatomiquement, possibilité de créer des compartiments tissulaires	Connaissance et technique complexe. Coût. Temps. Difficulté d'imagerie.	Polymère	[233, 247, 248]
Culture d'explant	Matrice native, interaction cellule-cellule réaliste. Compartimentation cellulaire exacte.	Approvisionnement complexe. Limité dans le temps. Difficulté d'image et de manipulation.	----	[249-251]

Tableau I-7 : Différents systèmes 3D avantages et inconvénients [213, 226, 252]

L'un des modèles les plus viables reste le vivant ou l'explant qui n'est autre qu'un morceau de tissu vivant remis en culture et maintenu, cependant ce genre de culture est très complexe à mettre en œuvre et très difficile à se procurer surtout dans le travail chez l'humain comme il est question ici.

La culture organotypique (la culture d'un tissu souvent extrait directement d'un organe ou créée à partir de cellules souches et cultivé comme si elle était dans ce dernier avec un milieu très complexe et des contraintes importantes) est un bon intermédiaire à ceci, cependant la technicité mise en œuvre, le coût et l'incapacité de mener à bien un screening avec celle-ci la met à mal vis-à-vis de beaucoup d'autres méthodes.

La méthode du « scaffold », mot très largement utilisé, désignant initialement la microstructure mise en place en tant que support pour la construction d'un objet sur ce dernier, a été reprise par la biologie pour parler de culture construite à partir d'une structure. Cependant la différence interindividuelle souvent marquée de ces techniques et la mise au point parfois complexe n'en fait pas une bonne méthode de screening simple pour le moment. On notera cependant un développement des possibilités de sphéroïdes soutenus par des « scaffolds » ce qui amène une linéarité et une régularité impressionnantes pouvant conduire à d'excellents modèles de screening.

Les "Organ-on-chip" (simulation de l'activité d'un organe par une puce microfluidique), s'ils peuvent permettre une étude poussée en possédant des possibilités de changements de milieu facile et donc une grande adaptabilité, ont les mêmes problèmes que les « scaffolds » dans le cadre de notre but (eg. problèmes de répétabilité et compétence nécessaire), et sont donc rapidement mis à mal.

Il reste donc les sphéroïdes, modèle connu depuis longtemps et de plus en plus exploité [228] qui partagent de nombreux points intéressants avec les autres modèles 3D sans pour autant impliquer une complexité insurmontable pour un chimiste de formation.

d. Le Modèle Sphéroïde

Le modèle sphéroïde consiste en un assemblage de cellules en 3D qui s'associent par non choix (la plaque ne permettant pas l'adhésion). C'est un modèle complexe qui permet d'avoir une approche bien plus proche du réel que les cultures 2D classiques. On retrouve ainsi par exemple dans ce modèle les différents gradients usuellement présents sur les tumeurs *in vivo* (Figure I-20).

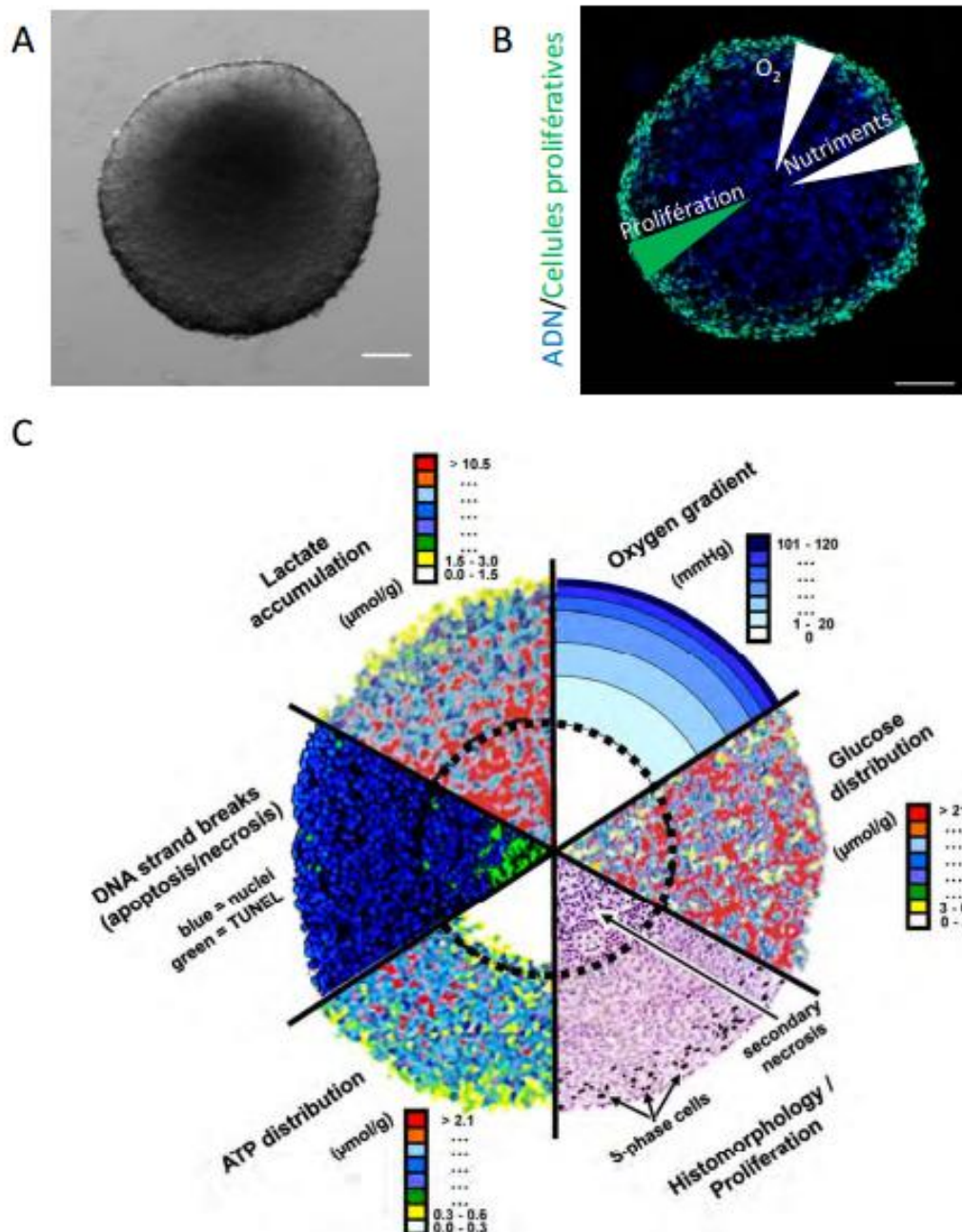


Figure I-20 : Modèle du Sphéroïde.

A) Image en transmission, B) Image d'une coupe de sphéroïde congelée en fluorescence dont l'ADN (Bleu) et les cellules prolifératives (vertes) sont marquées. Barre d'échelle 100μm. C) Combinaison d'image analogique de différents sphéroïdes représentant les différents gradients [253]

In vivo, des nodules tumoraux présentent des gradients d'oxygène et de nutriments. Ces derniers sont générés depuis le centre de la tumeur jusqu'à la zone d'irrigation la plus proche. De la même façon, la croissance des sphéroïdes s'accompagne de la mise en place d'un gradient croissant d'oxygène du centre souvent hypoxique à la périphérie [254].

Malgré l'existence de variations d'un modèle cellulaire à un autre [255], une rapide diminution de la pression partielle en oxygène de la périphérie vers le centre des sphéroïdes a été démontrée. Parallèlement au gradient d'oxygène, des gradients de glucose, de facteurs de croissance ou

d'hormones se mettent en place, tandis qu'un gradient de catabolites (lactates) s'établit de manière inverse [254, 256].

Les lactates sont une preuve que la cellule s'épuise ou manque d'oxygène, ce sont ce qu'on appelle des marqueurs de stress cellulaire ou catabolites. Ils sont créés par les mitochondries comme résidus de cycles cellulaires incomplets et marquent le début de problèmes cellulaires au centre du sphéroïde qui vont donner le possible cœur nécrotique.

On a donc logiquement une croissance exponentielle particulièrement basée à la périphérie du sphéroïde par les différents gradients de facteurs vus précédemment.

La distance de la périphérie (ou profondeur) à partir de laquelle la mortalité cellulaire est induite peut varier entre 50 à 300µm en fonction du modèle cellulaire utilisé, de la concentration et du taux de consommation de substrats cellulaires comme l'oxygène ou le glucose, du degré de compaction cellulaire, de l'accumulation de catabolites ou d'une augmentation de l'acidité cellulaire.

Il est maintenant admis que ce modèle est plus prédictif de la réponse au traitement que les modèles de culture en monocouche. Il peut être utilisé pour le criblage de molécules thérapeutiques anticancéreuses [257, 258].

e. Analyse des sphéroïdes

Afin d'utiliser les sphéroïdes comme modèle de tumeur, il importe de définir une méthodologie d'analyse de ceux-ci, afin de pouvoir caractériser l'efficacité thérapeutique du nanovecteur considéré. De nombreuses méthodes d'analyse des sphéroïdes existent [232, 259, 260]. La plupart des analyses modernes peuvent convenir aux sphéroïdes, que ce soit des techniques d'analyse de gène ou de point final (analyse détruisant les cellules ou leur environnement à un temps t). Ces techniques sont aussi précises que sur les monocouches 2D. Des essais de survie clonogénique (pour évaluer la viabilité de reproduction) ont même été accomplis à partir de mono-cellules issues de sphéroïdes mais sont extrêmement complexes [261].

De fait la technique la plus courante est le suivi de l'intégrité et de la croissance du sphéroïde [213]. L'analyse peut donc être rapidement obtenue par contraste de phase (ou fond noir) sur un microscope optique classique. On pourra ainsi en obtenir la taille et la cinétique de croissance.

De fait il n'y a pas de véritable contre-argument à l'analyse de la cinétique de croissance volumique du sphéroïde car parmi la couronne de cellules qui se détachent de ce dernier, certaines cellules peuvent être efficaces et vivantes, à l'opposé certaines cellules qui peuvent rester dans le sphéroïde peuvent aussi être mortes. Ainsi un équilibre se forme lorsque l'analyse est portée sur plusieurs jours sans toucher au sphéroïde pendant cette période.

De plus, une telle méthode permet aussi de connaître le retour à la croissance du sphéroïde après traitement, un détail qui est considéré d'importance dans la littérature [262] car il modélise, bien qu'imparfaitement, la reprise de croissance des tumeurs [263, 264].

L'autre méthode de choix pour l'analyse de sphéroïdes est la quantification de l'acide phosphatase (APH) qui permet de mesurer la viabilité cellulaire pour un seul sphéroïde [260]. Cependant, comme les autres systèmes utilisés par les différents groupes [265, 266], ces méthodes

sont destructrices et nécessitent la dissociation du sphéroïde. Elles ne permettent donc pas le suivi cinétique de la croissance, ni même la visibilité du retour de croissance après traitement.

f. Conclusion

Nous avons donc décidé de travailler sur un modèle 3D de type sphéroïde, ce dernier est connu pour sa capacité à donner des résultats viables mais parfois en fort désaccord avec ceux issus de modèles 2D mais se rapprochant de ceux obtenus avec l'in vivo, prouvant ainsi, si cela était encore nécessaire, la prévalence de ces modèles 3D.

Ces sphéroïdes seront réalisés avec deux lignées cellulaires distinctes : HCT-116 pour le cancer colorectal, lignée très connue et très employée permettant ainsi de comparer nos résultats avec ceux des autres laboratoires facilement, mais aussi FaDu, une lignée du cancer des VADS, type de cancer lui aussi traité en PDT ayant un visuel très proche des HCT-116 mais une croissance plus lente dans le cadre des sphéroïdes ainsi qu'un sphéroïde plus uniforme.

6. Cadre de l'étude

a. Philosophie

La connaissance approfondie des vecteurs développés dans la recherche reste encore aujourd'hui assez limitée. On sait qu'une DLS et une TEM ne permettent pas d'avoir une idée concrète de ce qu'on étudie. De là vient la nécessité d'être critique dans ses méthodes et de chercher à avoir une analyse des plus précises possibles.

C'est dans cette philosophie que s'inscrit cette thèse autant que dans l'idée de construire le début d'une corrélation entre ce qui est vu en analyse et les résultats biologiques. Cependant la biologie n'est pas notre cœur de métier et si nous avons fait notre possible pour en faire quelque chose de précis et d'aussi complet que possible, la pluridisciplinarité du sujet rend parfois impossible d'aller au fond d'un domaine pourtant très intéressant.

b. Outils

Pour les caractérisations et les analyses, nous utiliserons divers outils et les présenterons toujours dans le même ordre. Ces derniers sont la DLS, la TEM et le fractionnement flux-force qui ont été présentés en partie bibliographique.

Parfois les analyses SLS (diffusion statique de la lumière) ou AFM (microscopie à force atomique) viennent s'ajouter à ces techniques.

Les analyses biologiques ont été effectuées sur sphéroïdes pour les raisons déjà développées, amenant in fine un modèle bien plus proche de l'in-vivo particulièrement pour la vectorisation de nano-objets.

c. Introduction au développement

Dans ce cadre nous allons tenter de maintenir un développement cohérent au fur et à mesure des chapitres. Nous allons donc, autant que possible, garder le même plan tout au long de ceux-ci, et ce même si cela peut sembler un peu redondant. Le but est de permettre de se concentrer sur un domaine particulier et d'éviter les aller retours incessants qui auraient eu lieu si la thèse avait été partitionnée autrement.

Nous allons donc commencer par analyser les nano-objets dont il est question dans chaque chapitre, en gardant toujours, et autant que possible, un regard critique sur les techniques utilisées et les résultats. Puis, une fois les analyses routinières en batch passées, une analyse après séparation par AsFFFF viendra compléter les résultats.

Dans un second temps l'analyse sera biologique, apportant les derniers renseignements nécessaires à l'efficacité de ces objets chargés en phéophorbide a à 1/30ème molaire en les comparant aux autres objets du même groupe.

Enfin nous tenterons de conclure sur chaque chapitre avant d'apporter une conclusion plus globale sur la thèse.

Chapitre 2 :

Des vecteurs amphiphiles

II. Des vecteurs amphiphiles

1. Introduction

Comme expliqué précédemment, l'objectif de cette thèse s'axe autour d'une caractérisation critique des vecteurs polymères. Les premiers considérés dans ce travail sont basés sur l'association de copolymères amphiphiles, ce type étant le plus répandu dans la littérature. Ils seront soit de type « micellaire », soit vésiculaire (polymèresomes) (Figure II-1):

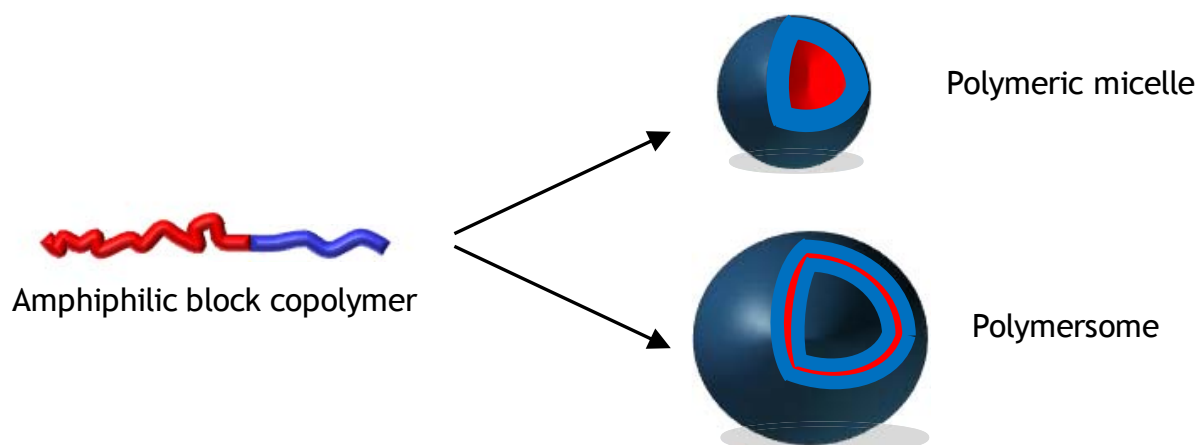


Figure II-1 : Représentation graphique de « micelles » polymères et de polymèresomes

Les micelles polymères, petits objets de l'ordre 10-50 nanomètres pour les plus courants, sont souvent sphériques. Elles possèdent une cavité hydrophobe et une couronne hydrophile. Ces objets sont massivement utilisés pour la nano-médecine car ils sont faciles à fabriquer et ont une faible taille ce qui a donc tendance à faciliter l'effet EPR. Leur cavité interne sert au transport de médicaments hydrophobes. Dans notre cas les médicaments encapsulés, le phéophorbide a dans la plupart des cas, étant hautement hydrophobes, les objets sont d'un grand intérêt. Il est important de noter que le terme de micelle dans ce travail n'est utilisé que dans le but de nommer la morphologie cœur hydrophobe/couronne hydrophile, par analogie avec les micelles de tensio-actifs connues depuis très longtemps. Cette analogie s'arrête là, les micelles de polymère étant pour la plupart formées sous contrôle cinétique et non thermodynamique.

Les polymèresomes, objets usuellement d'une taille supérieure à la centaine de nanomètres, sont composés d'une membrane à cœur hydrophobe délimitant un espace hydrophile comportant plus ou moins de liquide. Vers l'extérieur, une autre couronne hydrophile est formée. Ces objets sont très proches des vésicules lipidiques bien que possédant des cinétiques d'interaction avec leur environnement ou de mouvement intra-vecteur (e.g. flip-flop, déplacement, échange avec le milieu extérieur...) très différentes et peuvent recevoir aussi bien des molécules hydrophiles qu'hydrophobes grâce à la présence de la cavité interne et de la membrane.

Une sélection de ces objets va donc être caractérisée, puis utilisée en biologie. Seul un éventail du screening effectué en biologie sera présenté dans ce chapitre, d'autres seront ajoutés en annexe.

2. Objets de type micellaire

a. Introduction

Comme il a été précédemment indiqué, de nombreux polymères peuvent servir à la fabrication de micelles, et, même si des screenings commencent à être mis en œuvre [267], l'utilisation d'une large gamme de polymère reste peu répandue dans les études.

Dans notre cas, le choix a été fait de travailler principalement sur quatre micelles qui, étant donné leurs formules respectives, étaient susceptibles d'avoir un comportement différent. Ainsi, dans le but d'encapsuler du Phéo, nous avons travaillé avec différents polymères (Figure II-2) :

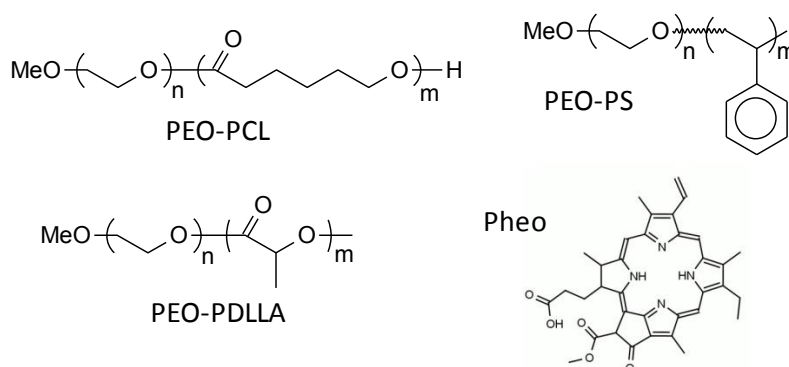


Figure II-2 : Représentation du PEO-PCL, PEO-PS, PEO-PLA et du Phéophorbide-a

Deux polymères de type polyesters ont tout d'abord été choisis, cette famille étant la plus couramment utilisée en nanomédecine pour la propriété de (bio)dégradabilité. Dans ce travail, le poly(oxyde d'éthylène-b-ε-caprolactone) (PEO-PCL), est utilisé avec deux masses molaires différentes de blocs : 2000-2800 et 5000-4000, chaque nombre représentant la masse molaire du bloc concerné. Ce choix avait pour but d'étudier la différence mise en place par la masse molaire du polymère pour une même nature chimique. Le Poly(oxyde d'éthylène-b-D,L-lactide (noté ici PEO-PLA) a été aussi choisi dans la même famille. Comparé à la PCL semi-cristalline, il est amorphe, et sa vitesse de dégradation est plus élevée.

Enfin, le poly(oxyde d'éthylène-b-styrène) (PEO-PS) est utilisé avec une masse molaire faible de 3100-2300 pour permettre une bonne clairance rénale [268] étant donné que le polystyrène n'est pas dégradé par le corps. Le vecteur formé est très intéressant par sa capacité à générer un champ de π -stacking qui pourrait générer une bonne interaction avec le noyau porphyrinique du Phéophorbide.

Tous ces objets ont été fabriqués via la méthode co-solvant détaillée en annexe.

b. Etude physicochimique usuelle des objets micellaires

Ces objets de petite taille font entre 8 et 30 nanomètres de diamètre (Tableau II-1)(Photos TEM et DLS en Annexe) quelle que soit la méthode d'analyse utilisée et ont une bonne stabilité de mesure en fonction des méthodes. Ainsi on retrouve classiquement des objets plus petits en analyse TEM à cause du séchage inhérent à la méthode, et, pour la DLS, plus grands lors des analyses en intensité que

celles en nombre, phénomène bien connu dû à l'influence de l'intensité de diffusion. Les potentiels zeta quant à eux sont globalement neutres ou très légèrement négatifs, ce qui est expliqué par la présence éventuelle de groupements carboxyliques après hydrolyse partielle des esters.

Polymère	Masse molaire	Diamètre moyen en intensité (DLS) (nm)	Diamètre moyen en nombre (DLS) (nm)	ξ (mV)	Diamètre moyen (TEM) (nm)
PEO(2000)-b-PCL(2800)	2000-2800	22.0	13.7	-10	13.7 ± 2.7
PEO(5000)-b-PCL(4000)	5000-4000	24.6	15.3	-10	12.6 ± 2.7
PEO(2400)-b-PLA(2000)	2400-2000	30.3	16.8	-2.4	n.d.
PEO(3100)-b-PS(2300)	3100-2300	19.9	13.2	-1.8	12.5 ± 2.5
PEO(2000)-b-PCL(2800) Phéo 1/30	2000-2800	27.2	13.6	-14.0	16.8 ± 2.7
PEO(5000)-b-PCL(4000) Phéo 1/30	5000-4000	25.6	10.6	-19.5	
PEO(2400)-b-PLA(2000) Phéo 1/30	2400-2000	30.4	10.5	n.d.	11.5 ± 3.5
PEO(3100)-b-PS(2300) Phéo 1/30	3100-2300	21.4	8.5	-14.9	

Tableau II-1 : Caractérisation des différents nano objets chargés ou non

Les analyses AsFIFFF de ces assemblages ont été ensuite effectuées à partir de la méthode présentée en méthodologie et les fractogrammes seront présentés en Figure II-7. Elles nous permettent en premier lieu de vérifier qu'une seule famille a bien été créée durant le processus et de mettre en évidence la faible dispersité des objets (Tableau II-2). Elles permettent également de s'assurer de la bonne encapsulation du principe actif à l'intérieur de l'auto-assemblage, et ce même dans des conditions de flux comme ceux présents dans un AsFIFFF. Enfin, la présence d'un analyseur MALS et RI en sortie nous permet d'évaluer un nombre d'agrégation (Nagg). Cependant il faut prendre ce nombre avec précaution car la petite taille des objets rend la détermination de la masse molaire totale difficile et parfois imprécise. Enfin le D_H donné par le QELS est comparable au D_H des analyses DLS. Le M_n est donné uniquement dans le but d'avoir un indice de polydispersité.

Polymère	D_H (nm)	M_w ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	M_n ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Nagg	$\mathfrak{D} = M_w/M_n$
PEO(2000)-b-PCL(2800)	20.2	960 000	947 000	200	1.01
PEO(5000)-b-PCL(4000)	26.8	$1.72 \cdot 10^6$	$1.70 \cdot 10^6$	190	1.01
PEO(2400)-b-PLA(2000)	16.2	$3.56 \cdot 10^5$	$3.47 \cdot 10^5$	80	1.03
PEO(3100)-b-PS(2300)	20.0	$5.49 \cdot 10^5$	$5.47 \cdot 10^5$	100	1.00

Tableau II-2 : Caractérisation par AsFIFFF des différentes micelles

Il est intéressant de noter la proximité d'analyse entre les différentes méthodes dans le cas de ces systèmes simples et mono dispersés. Elles sont toujours, sauf dans certains cas (comme celui de la TEM) dans le même ordre de grandeur, mais il est nécessaire d'utiliser ces méthodes d'analyses orthogonales pour pallier les défauts des méthodes d'analyse classique.

c. Analyse DLS/SLS

Nous avons eu la chance de pouvoir analyser certains nano-objets au Mans.

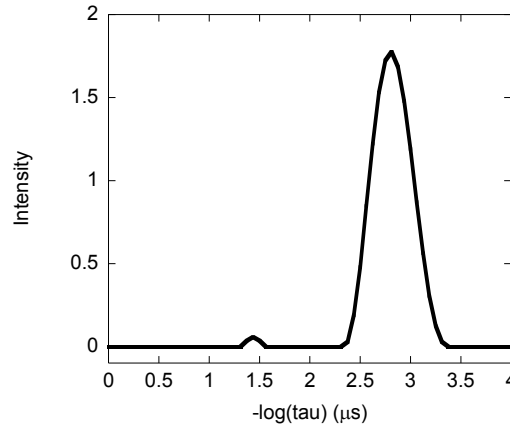


Figure II-3 : Exemple d'analyse DLS légèrement binomial, cas de PEO-PCL 5000-4000

L'appareil utilisé permet l'acquisition simultanée des données DLS et SLS. Dans un premier temps, les données DLS sont analysées pour déterminer le nombre de populations diffusantes et leur intensité relative. Un exemple typique est représenté Figure II-3, pour laquelle on note la présence d'un objet plus gros à $\tau \approx 1.5\mu\text{s}$ qui est parfois une poussière, parfois un objet particulier. Ce système observé devra être enlevé pour le traitement de la SLS et l'analyse de la population principale, mais il est important de garder dans l'idée le poids de celle-ci dans l'analyse. Ces analyses une fois menées à bien nous permettent d'obtenir des graphiques d'évolution de $1/\tau$ en fonction de q^2 (Figure II-4). Cette évolution étant linéaire, on a bien une diffusion classique de petits objets dans notre cas. Nous avons donc calculé le coefficient de diffusion D comme suit : $D = (q^2\tau)^{-1}$. A partir du coefficient de diffusion, le diamètre hydrodynamique de chaque objet diffusant a été évalué selon l'équation de Stokes-Einstein.

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi \eta D_t}$$

Équation II-1 : Equation de Stokes-Einstein

Les résultats sont présentés dans le Tableau II-3. Ils sont comparables à ceux obtenus par la DLS Malvern, à l'exception des micelles de PEO-PLA pour lesquelles une taille de 30 nm a été trouvée par Malvern et 19 sur la DLS multi-angle.

Polymère	D_H (SLS/DLS) (nm)	M_w (SLS/DLS) (g.mol ⁻¹)	N_{agg} (SLS/DLS)
PEO(2000)-b-PCL(2800)	22.2 ± 1.9	630 000	130
PEO(5000)-b-PCL(4000)	26.0 ± 1.1	551 000	60
PEO(2400)-b-PLA(2000)	19.0 ± 0.27	49 300	11
PEO(3100)-b-PS(2300)	19.3 ± 0.66	95 300	18

Tableau II-3 :Résumé des caractérisations DLS et SLS

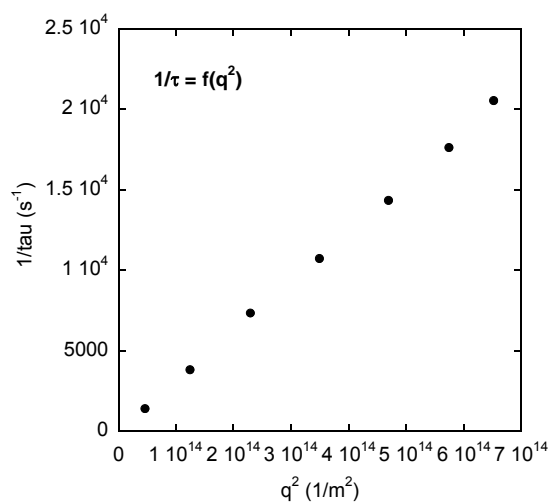


Figure II-4 : Exemple d'évolution de $1/\tau$ avec le vecteur de diffusion, cas du PEO-PCL 5000-4000

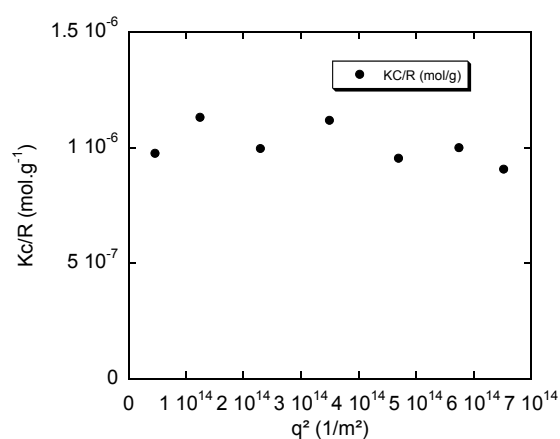


Figure II-5 : Exemple d'évolution du Kc/R_θ Cas du PEO-PCL-5000-4000

Comme indiqué plus haut, les données DLS nous permettent aussi de corriger celles obtenues en SLS pour éliminer la contribution de la population mineure de grande taille. Nous avons pu ainsi vérifier que Kc/R_θ était indépendant de q , ce qui est toujours vrai pour les petits objets, comme dans notre cas d'objet de type micellaire. La SLS nous donne donc accès à la masse molaire M_w de l'auto-assemblage grâce à l'Équation II-II-2, mais sa petite taille nous empêche de déterminer son rayon de giration.

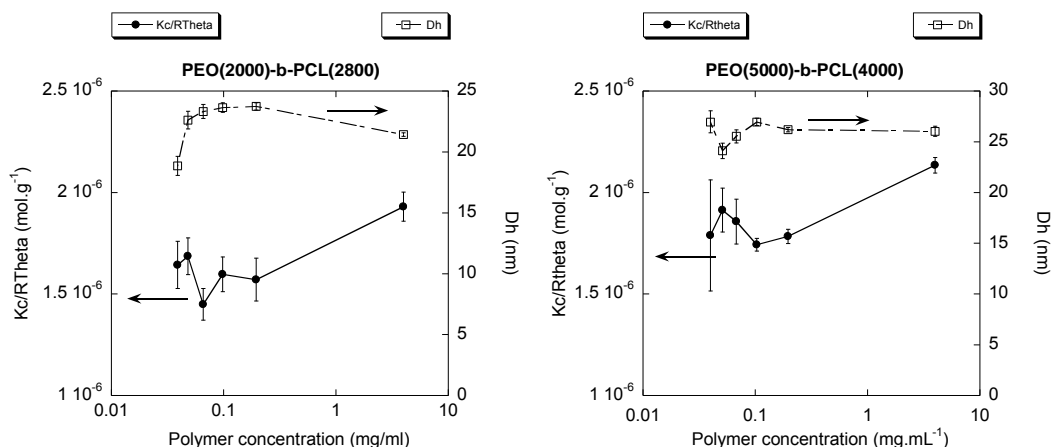
$$\frac{Kc}{R_{\theta,fast}} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) + 2A_2c$$

Équation II-II-2 : équation de Kc/R_θ

On remarque ici aisément que dans ce cas simplifié $M_w = (Kc/R_\theta)^{-1}$ puisque l'influence de q est nulle car R_g est très petit, et que la concentration c n'a pas de grande influence sur Kc/R_θ (Figure II-6) .

On peut donc ainsi tirer le nombre d'agrégation (N_{agg}), obtenu par la masse molaire de l'objet total divisé par la masse molaire du copolymère, remontant ainsi au nombre de molécules polymères par assemblage.

Ces valeurs sont plus petites comparées à celles obtenues par AsFIFFF, elles se situaient entre 10 et 130. La différence est particulièrement importante pour PEO(2400)-b-PLA (2000) et PEO(3100)-b-PS (2300) pour lesquels les nombres d'agrégation ont été trouvés respectivement près de 80 et 100 par AsFIFFF et seulement 11 et 18 par SLS. La sensibilité de l'instrument ALV (du Mans) nous permet de donner plus de fiabilité aux expériences SLS. Cependant un écart aussi important reste étonnant d'autant que l'AsFIFFF devrait nous permettre d'analyser seulement une famille d'objet et donc augmenter la précision. Il est à noter que les objets analysés en AsFIFFF et SLS sont bien les mêmes, étant donné que dans chaque cas l'analyse DLS associée indique la même gamme de taille hydrodynamique. Dans le cas de la SLS en batch, comme indiqué, des approximations sont faites qui permettent de calculer une valeur du M_w à partir de $(Kc/R_\theta)^{-1}$. Pour le cas de l'AsFIFFF, l'appareil utilise l'équation complète.



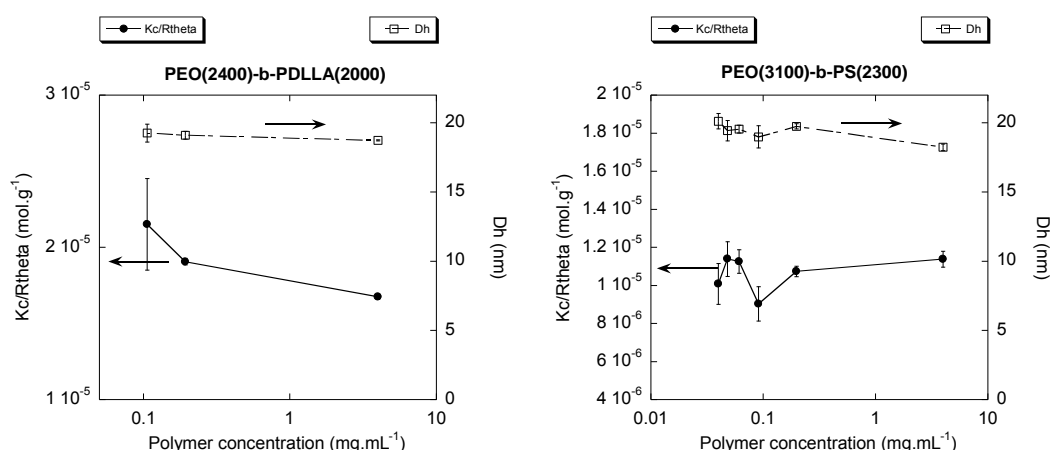


Figure II-6 : Caractérisation DLS et SLS des 4 micelles de polymères

Mais cette figure ne se borne pas à montrer uniquement cette indépendance et donc cette absence de coefficient A_2 qui est synonyme d'aggrégation à forte concentration.

Comme la dilution est un des points importants du test biologique, il est important de vérifier la stabilité des vecteurs à celle-ci. Bien que la dilution utilisée pour les essais biologiques (1/100 de 4g/L) ne doit pas conduire à une concentration finale inférieure à la concentration d'agrégation critique ($CAC = 2\text{mg.L}^{-1}$ pour PEO-PCL2000-2600), nous devons nous assurer que les objets restent stables lors de la dilution. En outre, la formation des auto-assemblages polymères peut être sous contrôle cinétique plutôt que thermodynamique, ce qui peut conduire à un comportement inattendu lors de la dilution.

En cas de dissociation des assemblages sous l'effet de la dilution, une importante chute de l'intensité diffusée devrait être observée, d'où une augmentation du paramètre Kc/R_θ . La Figure II-6 nous montre que celui-ci n'augmente pas à faible concentration et que les rayons hydrodynamiques de tous les objets analysés sont stables. Nos vecteurs peuvent donc être dilués bien au-delà des dilutions demandées pour des essais biologiques. La seule restriction est le cas de PEO-PLA 2400-2000, pour lequel la plus haute dilution fut 1/38, l'intensité diffusée devenant alors proche du signal du solvant. Nous n'avons donc pas pu atteindre la dilution utilisée en biologie.

La résistance à la dilution des micelles polymères, et plus généralement de la plupart des auto-assemblages polymères est très connue. Elle est liée à la cinétique très lente que suivent les nano-objets polymères. Il est donc courant de voir des nano-objets polymères bien en dessous de leur CAC. Cette absence de résistance à la dilution est au contraire un des problèmes courants retrouvé dans le cas des nano-objets lipidiques qui eux n'ont pas cette cinétique lente.

On a donc des objets très intéressants pour le transport de médicament car pouvant résister à une très forte dilution comme celle qui aura lieu une fois l'objet injecté dans le système circulatoire.

Toutes ces caractérisations ont été faites sur des assemblages vides, l'étape suivante impliquait donc d'analyser leur comportement en présence de leur chargement de Phéo. Contrairement à une pratique très courante dans la littérature, nous avons choisi des conditions de chargement permettant un taux d'encapsulation de 100% [269]. En effet, le Phéo donnant des bandes d'absorption différentes

selon son environnement hydrophobe ou aqueux, un simple spectre UV-Visible nous permet de vérifier que tout le Phéo est bien dans l'auto-assemblage.

Pour cela, l'analyse AsFIFFF est aussi utile, comme le montre la dans les cas des PEO-PLA et PEO-PS.

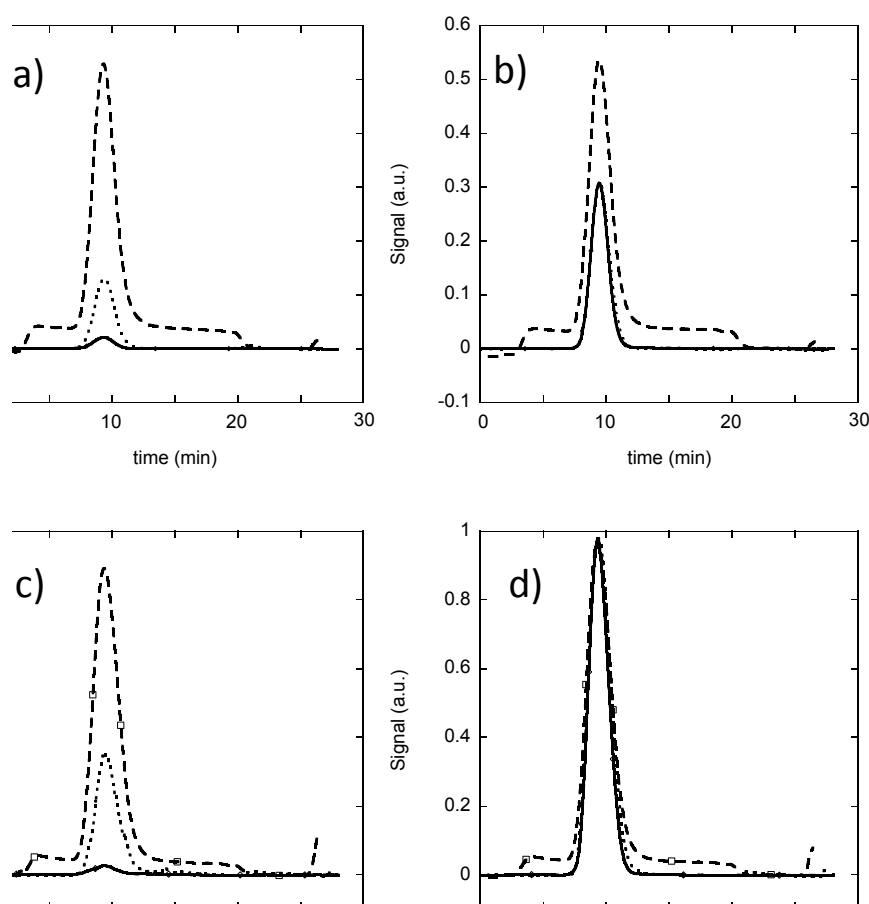


Figure II-7 : caractérisation AsFIFFF du PEO-PLA 2400-2000, PEO-PS 3100-2300. Les courbes pointillées, tirets, et complètes représentent respectivement les signaux MALS, RI, et d'absorption à 412nm caractéristique du Phéo. a) PEO-PLA 2400-2000, b) PEO-PLA 2400-2000/Phéo, c) PEO-PS 3100-2300, d) PEO-PS 3100-2300/Phéo

Dans les deux cas on observe bien le début de l'élution à 3 minutes, suivi par le pic objet entre 8 et 12 minutes avec un maximum à 10 minutes. Le pic a une belle forme et n'est pas très étalé, la dispersion des objets est donc faible en taille (PDI petit) et l'auto-assemblage composé que d'un seul type d'objet. On remarque enfin que les pics MALS et RI sont parfaitement superposés avec le pic d'absorption qui lui, répond en grande partie au signal du phéophorbide. L'auto-assemblage considéré comporte donc bien une charge de Phéo. En cas de présence de Phéo non encapsulé, la molécule photo-activable serait soit passée à travers la membrane (et serait donc invisible sur le fractogramme),

soit sortie au moment du pic d'injection. Avec les seules données d'AsFIFFF, on ne peut pas complètement éliminer l'hypothèse que du Phéo libre ait été éliminé par la membrane, mais dans ce cas, le spectre UV-visible en batch (visible en annexe [Figure 0-9]) l'aurait montré car la longueur d'onde d'absorption du Phéo change en fonction de son environnement, or on n'observe pas de pic caractéristique du Phéophorbide seul. L'objet encapsule donc 100% du Phéo. Des graphiques mettant en avant la non évolution du M_n ou du D_H au cours de l'élution sont présentés en annexes.

On a donc vérifié que les objets utilisés étaient bien mono-dispersés et ne présentaient qu'une seule population d'objet et qu'ils encapsulaient bien le Phéo comme attendu, même dans le cas de PEO-PLA qui pourrait être sujet à caution au vu de sa fragilité. Un autre point à considérer ensuite est la stabilité dans le temps de ces auto-assemblages et la vitesse de relargage du Phéo.

d. Stabilité dans le temps et délivrance

Dans une deuxième étape, la stabilité du système de délivrance de médicament a donc été évaluée. La stabilité des micelles elles-mêmes a été d'abord évaluée en suivant dans le temps l'évolution de leur taille par DLS (Figure II-8).

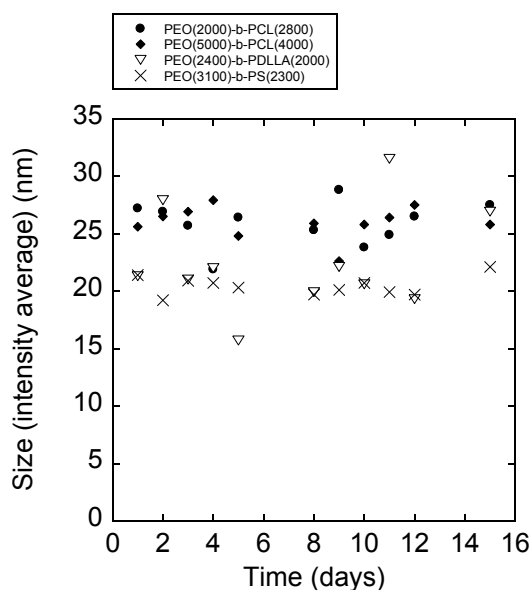


Figure II-8 : Stabilité à 37°C d'objets chargés en Phéo à 1/30 mol/mol suivie par DLS

Chaque solution a été analysée à plusieurs reprises sur une période de 14 jours les D_H proposés sont des termes moyens en intensité. Pour la plupart des solutions, le seul signe visible de l'évolution est l'apparition d'une plus grande population de taille supérieure à 500 nm.

Toutefois, cela n'a été observé que dans les valeurs moyennes en intensité et non sur celles des moyennes en nombre. Cela montre que, bien que présente, cette population plus importante en taille était mineure du point de vue de la concentration.

La Figure II-8 représente la taille hydrodynamique moyenne en intensité pour une concentration de 1/50 (de 4g.L⁻¹ soit 0.08g.L⁻¹) des différentes micelles polymères. Pour chacune d'elles, une bonne stabilité a été observée au cours de la période expérimentale. Comme on l'observe sur la Figure II-8, la taille des objets ne varie pas. Et ceci bien que la plus grande population ait augmenté lentement en quantité. Afin d'évaluer une bonne qualité des échantillons, nous avons décidé de ne pas utiliser des solutions de plus de 14 jours, bien que ce choix puisse apparaître assez drastique par rapport aux résultats de DLS. Les solutions de PEO-PLA 2400-2000 seront utilisées quant à elles dans les 10 jours, car la taille mesurée en DLS commence à évoluer à ce moment.

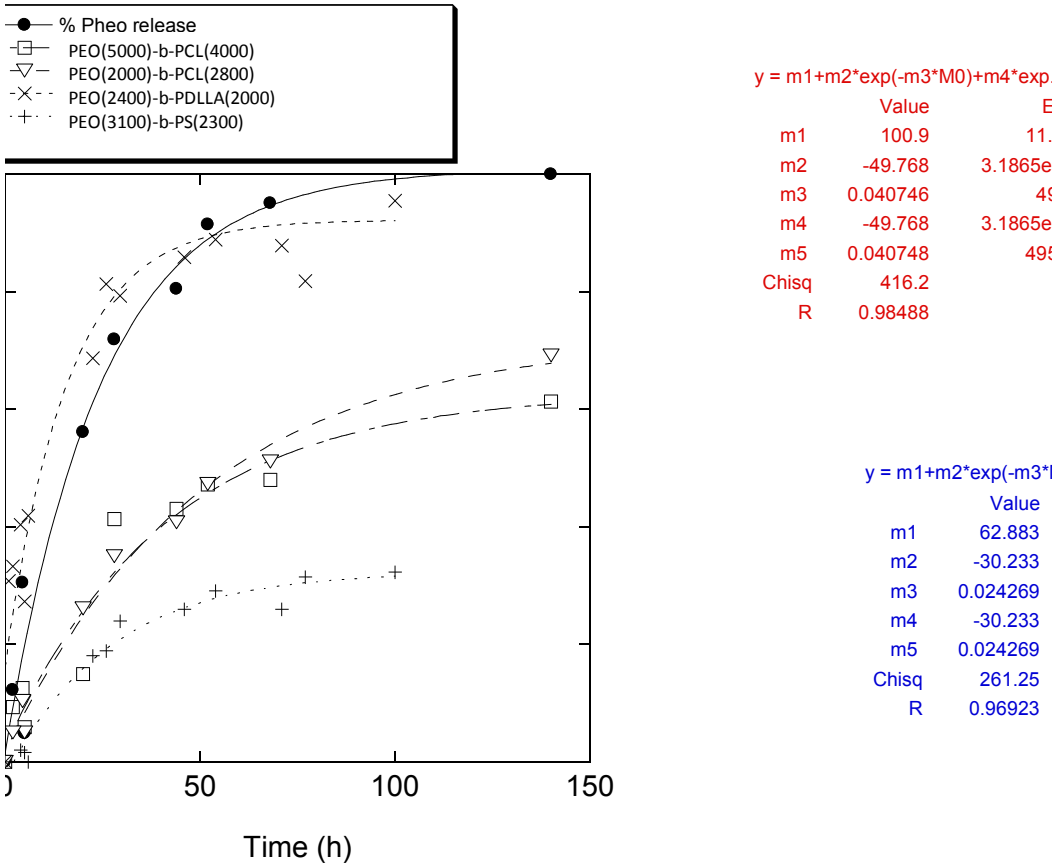


Figure II-9 :Relargage du Phéo par dialyse avec [Phéo]=10⁻⁶M à 37°C

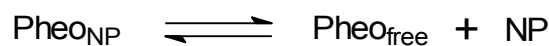
La libération de Phéo a été ensuite suivie par dialyse en utilisant des solutions de micelles polymères chargées en Phéo à 1/30 mol/mol et une concentration en Phéo de 10⁻⁶ M. A température ambiante, aucun rejet n'a été observé sur 12 jours.

A 37 ° C, une libération lente a été observée sur plusieurs jours (Figure II-9). On observe que le Phéo non encapsulé est complétement sorti au bout de 3 jours, tandis que les micelles PEO-PCL contiennent encore la moitié de la concentration de Phéo de départ à ce stade de vieillissement.

Les micelles PEO-PS 3100-2300 présentent la libération la plus lente (30% au bout de 4 jours). Une différence forte a été observée pour les micelles PEO-PLA, qui présentaient presque le même schéma de dialyse que Phéo libre. Etant donné que les spectres d'absorption UV-visible et les

caractérisations AsFIFFF ont montré que le Phéo a en effet été encapsulé dans le PEO-PLA 2400-2000 (ou au moins dans un environnement hydrophobe), ce résultat de dialyse montre que le Phéo est très facilement libéré des micelles. Ces micelles PEO-PLA ne peuvent donc pas être considérées comme des vecteurs efficaces. Comme les traitements PDT sur sphéroïdes ont été effectués sur plusieurs jours, ce fait important doit être gardé à l'esprit. Ce résultat peut être rapproché de certaines études de la littérature montrant une libération instantanée de la doxorubicine à partir de micelles PEO-PLA après l'injection [270].

Les courbes de relargage ont été ensuite modélisées pour en extraire les affinités des différents systèmes sachant que les dialyses étaient suivies face à un volume fixe.



$$K = [\text{Phéo}_{\text{free}}][\text{Polymère}]/[\text{Phéo}_{\text{NP}}]$$

Les valeurs de K obtenues sont:

PEO(2400)-b-PLA(2000)	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
PEO(2000)-b-PCL(2800)	$2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
PEO(5000)-b-PCL(4000)	$2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
PEO(3100)-b-PS(2300)	$1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Les valeurs de K obtenues par analyse des courbes de dialyse indiquent une affinité dans l'ordre PEO-PLA < PEO-PCL < PEO-PS. Plusieurs phénomènes rentrent en jeu dans le relargage, comme les interactions potentielles Phéo/polymère ou la mobilité des chaînes polymères (transition vitreuse ou présence de zones cristallines). Le polylactide utilisé est un polymère amorphe avec une Tg proche de 50°C pour le polymère massif. A 37°C et sous forme de micelles, il est vraisemblable que le cœur ne soit pas complètement figé, aidant ainsi le relargage du Phéo qui ne présente pas d'interaction particulière avec les groupes polyesters. La polycaprolactone quant à elle présente une Tg vers -60°C en masse, elle est donc clairement dans une phase caoutchoutique à 37°C. Toutefois, les chaînes ont la possibilité de former des zones cristallines même dans ces assemblages, ce qui peut limiter le relargage du Phéo. Enfin, le polystyrène quant à lui a une Tg vers 100°C et le cœur des micelles est donc figé. De plus, le Phéo peut interagir par π - π stacking avec les noyaux styréniques, ce qui conduit à la libération la plus lente.

e. Effet biologique

Avant d'évaluer l'efficacité PDT des différents systèmes, la toxicité des vecteurs polymères seuls a été examinée en utilisant le test "presto blue" sur cellules en plaque 96 puits. Les résultats sont présentés dans la Figure II-10 (test effectué par Laure Gibot). Aucun des vecteurs polymères ne présentaient de toxicité dans l'intervalle utilisé pour la PDT, c'est-à-dire une concentration en Phéo de

l'ordre de $3.3\mu\text{M}$ et inférieur. Il est intéressant de noter que pour une courte durée d'incubation, nous avons observé une augmentation de la viabilité cellulaire qui pourrait probablement être due à une augmentation du nombre de cellules par puits. Certains vecteurs pourraient donc être des promulgateurs de la croissance cellulaire par effet d'interaction avec les cellules ou simplement par effet de stress.

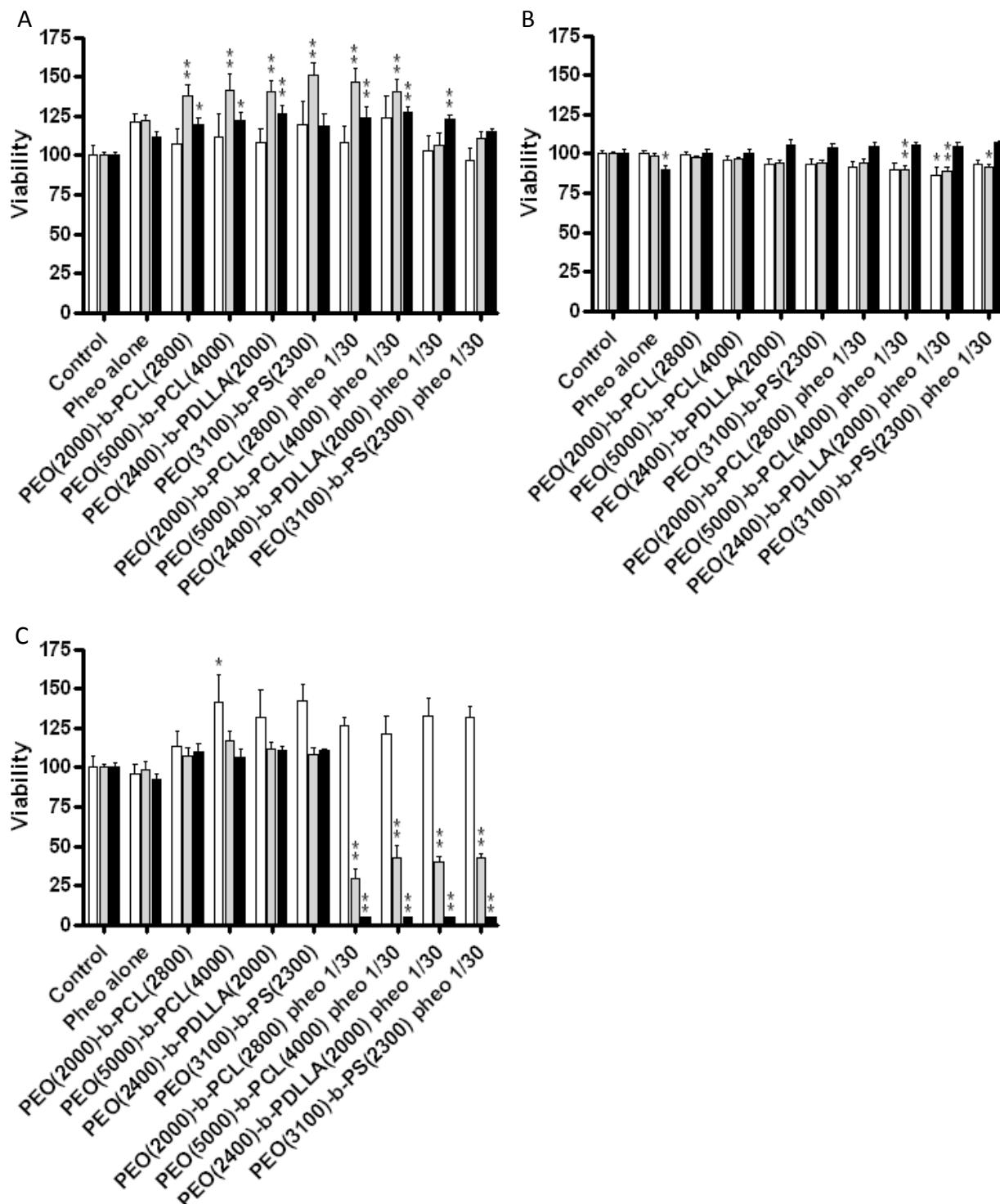


Figure II-10 : Cytotoxicité et phototoxicité des polymères, seuls ou avec phéophorbide présenté en concentration croissante.

a) 30 minutes d'incubation. b), 48 h d'incubation. c), 30 min d'incubation suivie de l'illumination. Barre blanche : 0,033 μ M Phéo, barre grise: 0,33 μ M Phéo, barre noire: 3,33 μ M Phéo. n = 6. *: P < 0,05. **: P < 0,01

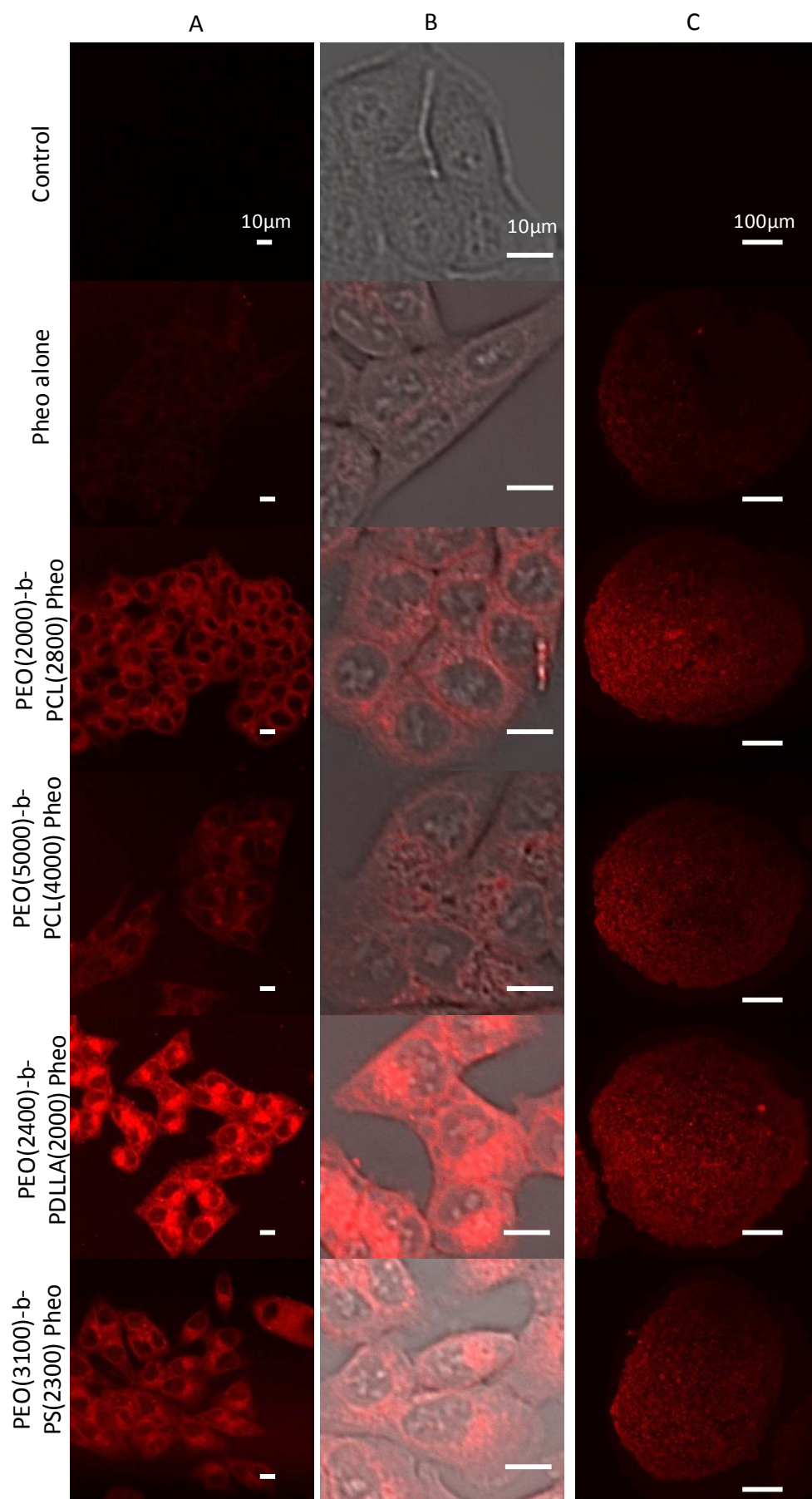


Figure II-11: Localisation du phéophorbide libre ou encapsulé dans les cellules tumorales HCT-116 cultivées en 2D ou 3D. a), cellules 2D incubées 30 min à 37 ° C avec 5 µM phéophorbide observées par microscopie confocale. Les images confocales sont les projections maximales d'intensité de la section complète de z. b), sphéroïdes vivants incubés 30 min à 37 ° C avec 5 µM de phéophorbide observés par microscopie à deux photons. Photos représentant une pile d'environ 150 µm du sphéroïde. La fluorescence du phéophorbide est rouge.

Pour comparer l'efficacité de l'administration de médicaments des différents nano-systèmes, la pénétration cellulaire du Phéo libre et chargé dans des nano-vecteurs polymères a été étudiée par microscopie à fluorescence.

Comme le montre la Figure II-11, les images de contrôle n'ont montré aucune auto-fluorescence des cellules 2D et des sphéroïdes, ce qui indique que l'ensemble de la fluorescence rouge est due à la présence de phéo.

Le Phéo seul ainsi qu'encapsulé a pu visiblement pénétrer dans les cellules en monocouche à la fois saines et tumorales (Figure II-11) de type HCT-116. La fluorescence est concentrée dans le cytosol, quelle que soit la micelle polymère utilisée. Ceci est cohérent avec l'étude de Tang et alii [271], où la fluorescence du phéophorbide peut être recouverte par le motif de la mitochondrie colorée par MitoTracker verte 36, ce qui corrobore donc la thèse que le phéo est principalement présent dans les mitochondries. Après 30 min d'incubation à 37 ° C, les micelles ont assuré une augmentation de la pénétration cellulaire du Phéo comparée à celle d'un Phéo non vectorisé par un nano-objet.

Il est possible de pousser la réflexion un peu plus loin après intégration de la fluorescence sur ces images. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'il est impossible en toute rigueur de différencier la fluorescence du Phéo libre de l'encapsulé, même si le Phéo libre présente une fluorescence très limitée (comme abordé dans le chapitre bibliographie). Comme le montre la Figure II-11 et après intégration de la fluorescence cellulaire (Tableau II-4), les micelles de copolymère PEO-PLA semblaient être le système de livraison le plus efficace dans ces conditions par rapport aux micelles de PEO-PCL. Ceci est particulièrement vrai pour les objets 2D mais semble aussi assez marqué pour les objets de type sphéroïde 3D.

Polymère	Intensité totale (UA)
PEO(2400)-b-PLA(2000)	1.9 10 ⁶
PEO(3100)-b-PS(2300)	1.3 10 ⁶
PEO(2000)-b-PCL(2800)	1.3 10 ⁶
PEO(5000)-b-PCL(4000)	0.9 10 ⁶
Phéo seul	0.7 10 ⁶

Tableau II-4 :Intensité de fluorescence des images 2D

Les micelles de PEO-PS semblent d'aussi bon transporteurs que les micelles de PEO-PCL 2000-2800. Ceci semble plutôt contraire aux résultats de dialyse où les objets de PEO-PS avaient un très mauvais relargage du Phéophorbide qui restait encapsulé à des temps très longs. Cependant il est important de remarquer que ce milieu comporte bien d'autres protéines et transporteurs possibles apportés par le sérum, il n'est donc pas étonnant que les ordres puissent être bousculés.

Nous remarquerons tout de même que l'ordre des effets entre le PEO-PCL 5000-4000 et le PEO-PCL 2800-2000 reste respecté (les PEO-PCL 2000-2800 étant les plus efficaces dans tous les cas) et semble suivre le même schéma que pour les dialyses.

L'efficacité de ces vecteurs pour la PDT a ensuite été évaluée sur des objets 3D de type sphéroïdes. Ils ont en premier lieu été testés par Laure Gibot sur des HCT 116 (l'évolution de volume n'a pas été mesurée) remarquant simplement une différence entre les PEO-PLA et les autres micelles, les PEO-PLA semblant avoir une efficacité inférieure dans le cadre des systèmes 3D (Figure II-11).

Cette différence peut être expliquée par la facilité de relargage du phéophorbide sur les premières couches de cellules dans le cadre des micelles PEO-PLA. La molécule photo-active ne diffuse donc pas dans l'assemblage tumoral et est uniquement dans la couronne externe des cellules au moment de la photo-activation tuant simplement la première couche de cellules et n'apportant rien aux autres cellules.

On a donc un assemblage qui en 2D est viable d'un point de vue de vecteur car relargant facilement une grande quantité de Phéo. Mais dans le cas des cultures de type tumeur 3D où la diffusion des nano-objets prend un degré important, ceci peut-il combler l'absence de diffusion ? Ces études préliminaires sont à prendre avec précaution car qualitatives. Nous avons donc analysé les micelles (chargées ou non en Phéo) sur des sphéroïdes, cette fois en quantifiant la taille du cœur en fonction du temps. La méthode utilisée est détaillée en annexe.

Dans le même temps nous avons étudié par curiosité une autre micelle d'environ 30nm de diamètre en PEO-PS 6000-19500 qui a la particularité de faire des nano-objets de formes étonnantes telles que des petites micelles très légèrement allongées comme des petit bâtonnets (TEM présenté en annexe (Figure O-1)). Le but de ce test était d'analyser l'influence de formes très variées sur l'efficacité en PDT. En effet, de plus en plus d'études dans la littérature montrent l'importance de la forme du vecteur dans son transport et sa pénétration dans les cellules [272].

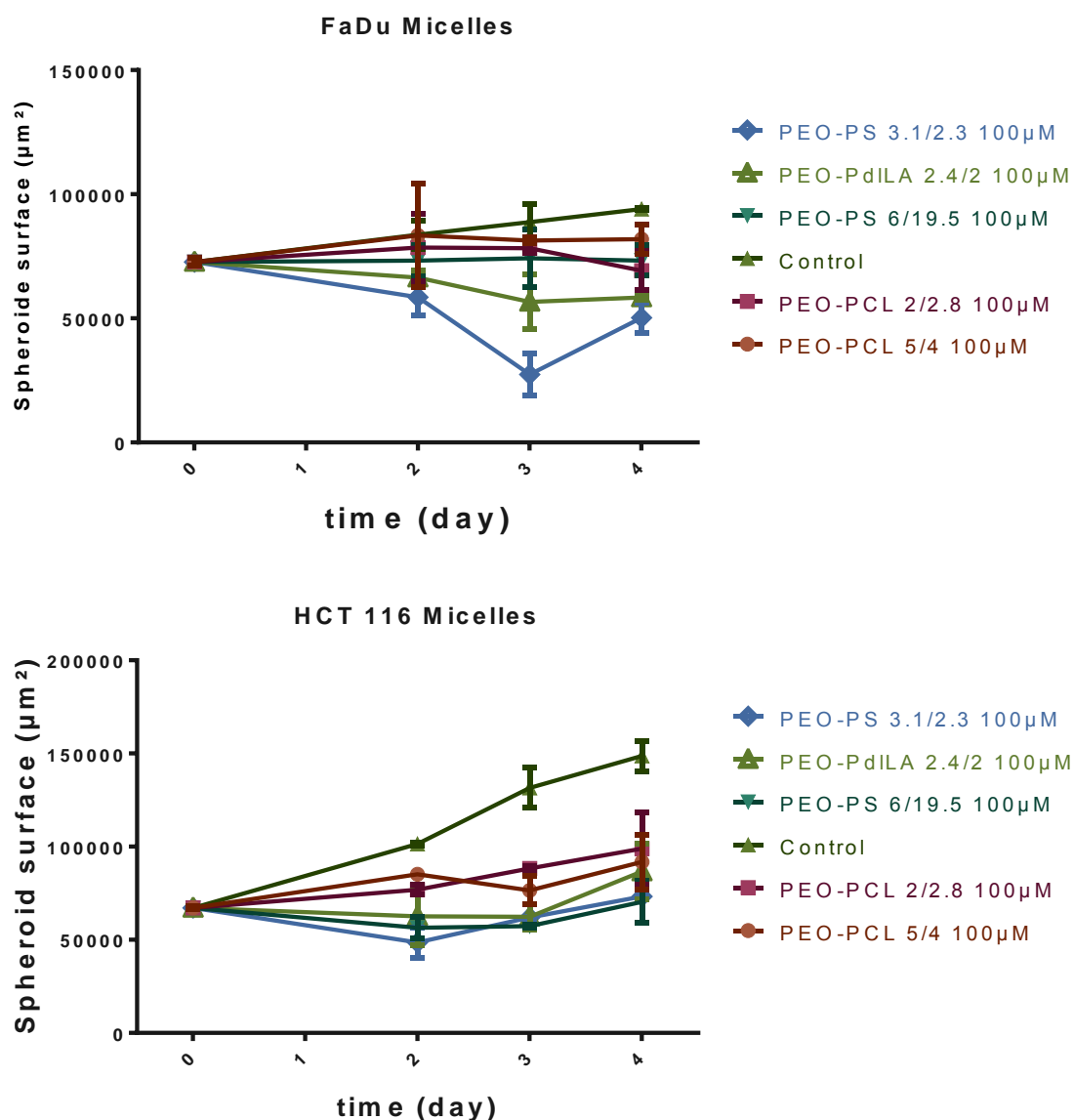


Figure II-12 : Effet sur les sphéroïdes de différentes micelles. La concentration indiquée sur les figures est celle en polymère. Le rapport [polymère]/[Phéo] est toujours égal à 30/1

Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure II-12 et montrent plusieurs choses :

Dans le cadre des micelles sur la lignée FaDu, seuls deux objets se dégagent du fuseau, les micelles de PEO-PS 3100-2300 (noté 3.1/2.3) et de PEO-PLA 2400-2000 (noté 2.4/2) qui semblent compenser leur libération à temps court par une très forte libération.

Pour les micelles de PEO-PS 3100-2300, les plus efficaces dans ce cas là, l'explication la plus probable est cette capacité de diffusion le long des cellules permettant d'abandonner du Phéo sur une large épaisseur de sphéroïdes permettant lors de la photo-activation, la destruction et le détachement d'une couronne plus épaisse.

Dans le cas du PEO-PLA, l'explication la plus probable reste que le PEO-PLA 2400-2000 abandonne rapidement tout le Phéo encapsulé qui était présent dans ses micelles. Ainsi la forte charge en phéo dans le milieu et dans les cellules pourrait permettre une diffusion de ce dernier soit après la mort cellulaire, soit en intercellulaire.

Pour les HCT 116 deux fuseaux peuvent être différenciés, celui des PEO-PCL et celui des PEO-PS et du PEO-PLA. Il devient dans ce cas intéressant d'observer la variation nette d'efficacité du PEO-PS 6000-19500 entre les FaDu et les HCT 116. Car si les deux autres ont une efficacité comparable, c'est cette micelle particulière qui change de fuseau pour rejoindre celui des autres objets. On a donc un objet plutôt intéressant.

Cette différence de comportement entre lignées a été notée pour d'autres objets et, même si elle est difficilement explicable sans test supplémentaire, elle reste fortement intéressante car elle marque des objets plus spécialisés.

Nous avons donc testé diverses micelles mais si ce n'est les PEO-PS 3100-2300 aucune de ces dernières ne peut être vraisemblablement différenciée des autres par des méthodes statistiques. On obtient un fuseau de résultats qui semble se centrer autour de l'arrêt de croissance du sphéroïde l'obligeant à conserver une taille constante durant le traitement.

Ces effets, bien que supérieurs à ceux du phéo seul, n'en sont pas moins inférieurs à un traitement idéal conduisant à la disparition complète de la tumeur.

3. Polymèresomes

a. Introduction

Les principaux polymères choisis pour cette étude sont présentés dans le Tableau II-5. Deux types ont été choisis. Le premier est, comme dans le cas des micelles, le poly (oxyde d'éthylène-b-ε-caprolactone) (PEO-PCL) pour sa pertinence relative à l'application visées. Dans cette famille, plusieurs masses molaires ont été examinées, dans le but d'obtenir des polymèresomes de différentes tailles. Ils ont été choisis de manière à avoir un changement de la balance hydrophile/hydrophobe en gardant à l'esprit la règle suggérant que les polymèresomes devraient être obtenus avec une fraction de masse hydrophile préférable près de 35% [267].

L'autre type de polymère qui a été testé est le poly (oxyde d'éthylène-b-méthacrylate de méthyle) (PEO-PMMA) afin d'évaluer l'influence de la structure chimique du vecteur. Un commentaire est nécessaire pour ce polymère. Celui-ci a été acheté, comme tous les autres, à Polymer Source. Il a été inclus dans cette étude car des tests préliminaires avaient montré qu'il conduisait facilement à des assemblages de taille supérieure à 100 nm que l'on supposait être des vésicules. Le contrôle de ce polymère a toutefois montré que la masse molaire annoncée par le fournisseur était complètement fautive, nos mesures (SEC et RMN ¹H) évaluant sa composition plutôt vers 1400-5600. Les analyses ont de plus révélé que ce polymère n'était pas pur et comportait une quantité non négligeable d'une entité non identifiable (protons aromatiques entre autres). Les expériences faites avec ce polymère doivent donc être prises avec précaution et nous ont surtout permis de développer les méthodes de caractérisation des objets vésiculaires et de comparer différents systèmes entre eux.

En fonction du polymère et des masses molaires, différentes méthodes de préparation ont été utilisées. La première est basée sur des techniques de formation de liposome et utilise une réhydratation du film de polymère, puis traitement aux ultrasons et extrusion.

Pour PEOPCL 5000-32000, cette méthode ne conduit qu'à des nano-objets peu stables et n'a donc pas été utilisée. Une alternative a été préférée selon une procédure décrite par Sachl et alii [273] (décrite dans la partie matériel et méthode).

Enfin, dans le cas de PEO-PMMA 1400-5600, l'extrusion s'est avérée impossible, les objets étant incapables de passer à travers le filtre. Cela a été attribué à la forte résistance mécanique de la base de PMMA (température de transition vitreuse à 105 ° C), par rapport à la polycaprolactone (température de transition vitreuse à -60 ° C). Dans ce cas, un procédé de nano-précipitation a été utilisé avec de l'acétone comme co-solvant (cf méthodologie).

Polymère	Mn du bloc PEO (g.mol ⁻¹)	Mn du bloc hydrophobe (g.mol ⁻¹)	f _{hydrophile} (%)	Méthode de préparation
PEOPCL 2000-4800	2000	4800	29.4	Réhydratation de film
PEOPCL 2000-7000	2000	7000	22.2	Réhydratation de film
PEOPCL 5000-11000	5000	11000	31.2	Réhydratation de film
PEOPCL 5000-32000	5000	32000	13.5	Dialyse
PEOPMMA 1400-5600	1400	5600	20.0	Nanoprécipitation

Tableau II-5 : formation des polymèresomes

b. Analyse TEM et AFM

Comme dans le cas des micelles, les premières analyses ont consisté dans les caractérisations par DLS et TEM. L'imagerie par AFM et l'analyse simultanée DLS/SLS ont complété les informations obtenues.

Pour les techniques de microscopie TEM et AFM, l'échantillon doit être séché et on ne l'observe que sur une étroite plage d'échelle de taille. Des images typiques pour les systèmes présentés ici sont données dans les Figure II-13 et Figure II-14.

Dans l'analyse TEM, deux types d'images peuvent être décrites, montrant des objets soit sphériques/ovoïdes soit allongés. Les systèmes sphériques ont été analysés pour extraire leur distribution et cela a montré des populations plutôt polydisperses. En AFM, le même commentaire s'applique aussi bien pour des formes rondes que pour les nano-objets en bâtonnet qui sont plus difficiles à évaluer.

La gamme d'amplitude moyenne de la taille des auto-assemblages sont résumés dans le Tableau II-6. Selon les auto-assemblages, de petites structures de 20nm de diamètre sont parfois observées, mais aussi des plus gros objets de l'ordre de centaines de nanomètres.

Bien que ces techniques donnent des informations précieuses sur l'échantillon, elles souffrent de l'incertitude du processus de séchage et de coloration. Les images ne sont pas nécessairement représentatives des objets réels dans la solution, agglomération et même parfois changement complet de forme peuvent arriver du fait de la déshydratation.

Pour cela, dans certains cas, les cryo-MET ou cryo-SEM peuvent être effectués, mais les objets petits et mal contrastés sont encore souvent difficiles à observer.

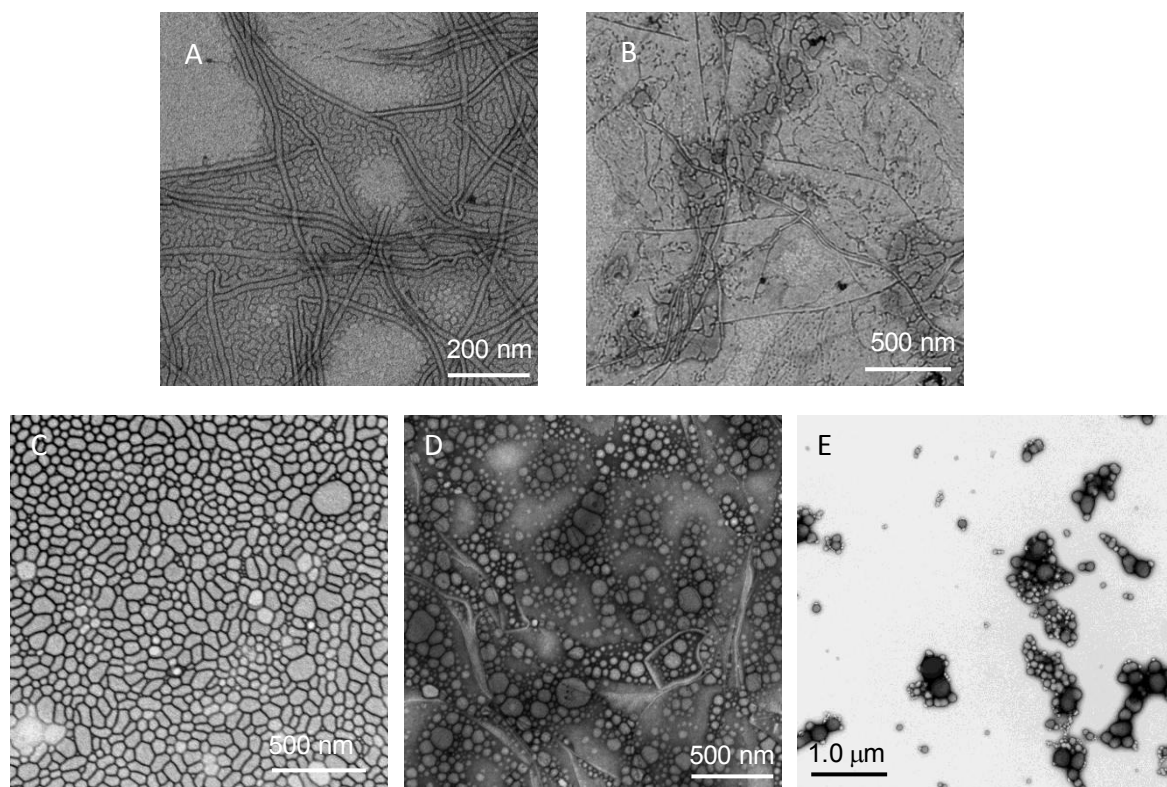


Figure II-13 : TEM des différents objets : A. PEOPCL 2000-4800; B. PEOPCL 2000-7000; C. PEOPCL 5000-11000; D. PEOPCL 5000-32000; E. PEO-PMMA 1400-5600

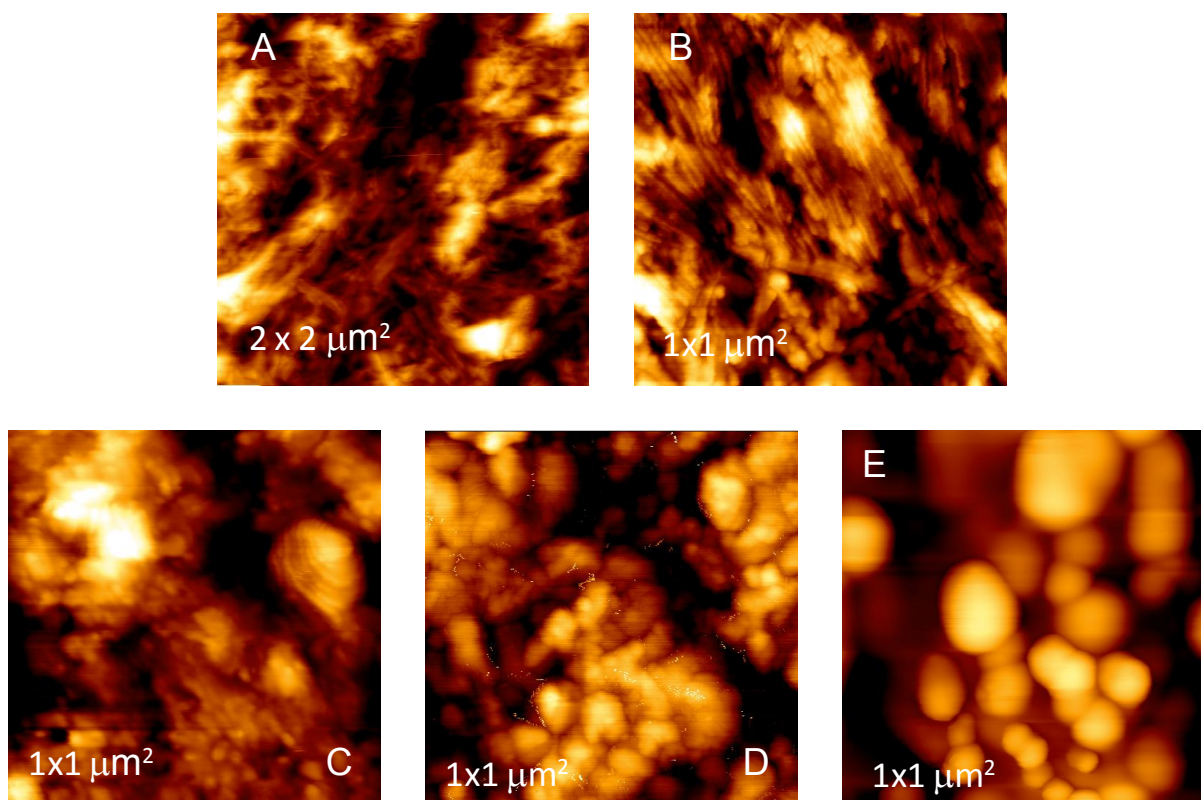


Figure II-14 : taille en AFM des différents objets : A. PEOPCL 2000-4800; B. PEOPCL 2000-7000; C. PEOPCL 5000-11000; D. PEOPCL 5000-32000; E. PEOPMMA 1400-5600

Polymères	TEM	AFM
PEOPCL 2000-4800	Objets allongés de 20nm de largeur, objets d'une centaine de nm de long, structures de 20-100 nm	Pas d'objets clairement définis
PEOPCL 2000-7000	Pas d'objets clairement définis, structure allongée	Objets allongés, plusieurs centaines de nm de long
PEOPCL 5000-11000	Objets ovoïdes bien définis de diamètre 50-200 nm, 62.6 ± 28.1 nm	Agrégat d'objets sphériques de taille unitaire 20-50 nm
PEOPCL 5000-32000	Sphères bien définies de diamètre 20-100nm, 39.9 ± 15.9 nm	Agrégat d'objets sphériques de 20-80 nm
PEOPMMA 1400-5600	Sphères bien définies de 20-300nm, Agrégats, 121 ± 77 nm Pour les nano-objets uniques	Agrégats de sphères bien visibles de taille 60-200 nm

Tableau II-6 : Résumé des différentes observations TEM et AFM pour les polymèresomes

Nous avons donc cependant observé trois grandes familles d'objets :

La première constituée par les PEO-PCL 5000-11000, PEO-PCL 5000-32000 et PEO-PMMA 1400-5600 est composée de nano-objets sphériques ou ovoïdes plus ou moins agglomérés et avec une

polydispersité élevée. Ce sont cependant les objets que l'on conçoit aisément lorsqu'on parle de polymèresomes.

La seconde famille représentée par le PEO-PCL 2000-7000 est une famille qui intéresse beaucoup les biologistes pour sa capacité théorique démontrée par Venkataraman et Alii [272] à passer les défenses immunitaires avec plus d'aisance que les autres grâce à sa forme allongée en spaghetti ou bâtonnet.

La troisième famille rarement étudiée et qui pourtant est courante, est ce genre d'assemblages de divers objets pouvant être longs ou plus ou moins sphériques que représente le PEO-PCL 2000-4800. Cependant cette multiplicité de morphologie pourrait très bien être liée au séchage. Il est donc essentiel d'associer ces analyses par microscopie à d'autres techniques.

c. Analyse DLS/SLS

Ces objets ont aussi pu être analysés en DLS et SLS au Mans comme les micelles. Par opposition aux techniques précédentes de TEM et AFM, il est possible d'analyser l'objet en solution. Comme dans le cas des micelles, l'analyse simultanée DLS/SLS nous a permis d'accéder au rayon hydrodynamique, ainsi qu'au nombre d'agrégation de l'objet. Cependant, les objets ici étant de taille supérieure, la SLS nous permet d'évaluer aussi le rayon de giration. La connaissance du R_h et du R_g est intéressante d'un point de vue analytique, car le rapport R_g / R_h fournit des informations sur la forme de l'auto-assemblage.

Pour les sphères homogènes, ce rapport devrait être 0,774. Pour les sphères vides telles que des polymèresomes la valeur devrait approcher 1 et pour les objets allongés, cette valeur peut augmenter jusqu'à 2 en fonction de l'anisotropie.

Ces informations sont importantes pour des applications médicales, car, comme déjà mentionné, les études montrent de plus en plus que la forme d'un nanovecteur déterminera son cheminement *in vivo* et va donc influencer sur la délivrance de médicaments [272].

Tous les systèmes présentés dans cette partie ont donc été analysés par SLS et DLS. Des résultats caractéristiques de SLS et DLS sont représentés sur la Figure II-15, montrant ici encore la linéarité de Kc/R_θ en fonction de q^2 et une distribution.

Dans le but de pouvoir faire les analyses complètes des nano-objets il a été nécessaire de mesurer leur dn/dc . Les résultats sont présentés dans le Tableau II-7 Cependant deux cas n'ont pas été renseignés :

- le PEO-PCL 2000-4800 qui, comme nous le verrons, est extrêmement polydisperse et pourrait avoir des dn/dc différents en fonction des assemblages.

- le PEO-PCL 5000-32000, qui à cause de la turbidité de la solution n'a pas pu être analysé de façon fiable. Nous avons donc estimé le dn/dc de cet objet à partir de l'analyse AsFFFF en supposant le taux de recouvrement de 100%.

Polymère	dn/dc (mL.g ⁻¹)
PEO-PCL 2000-4800	n.d.
PEO-PCL 2000-7000	0.152
PEO-PCL 5000-11000	0.149
PEO-PCL 5000-32000	Déterminé par AsFIFFF à 0.125
PEO-PMMA 1400-5600	0.156

Tableau II-7 : dn/dc des polymèresomes

Les valeurs qui ont été déterminées sont rapportées dans le Tableau II-8.

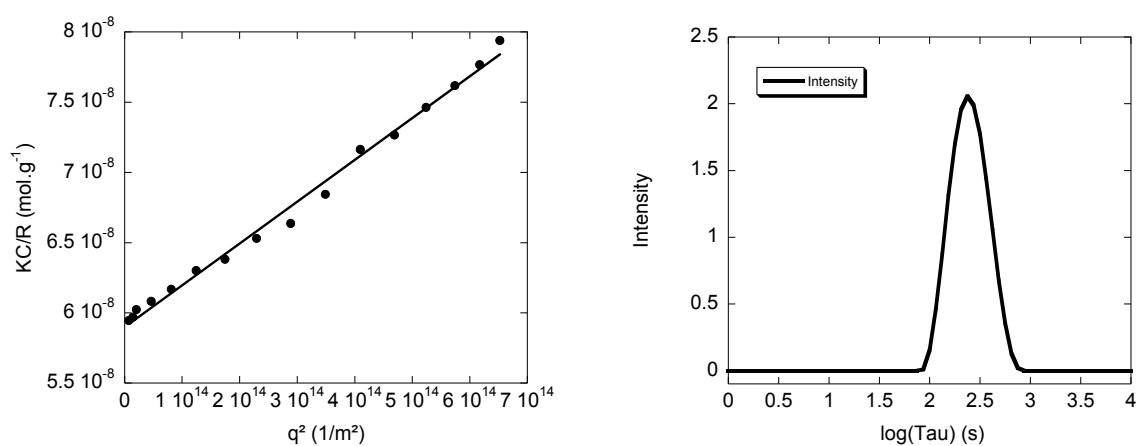


Figure II-15 : SLS et DLS typiques de polymèresomes

Polymère	R _g (nm)	R _h (nm)	R _g /R _h	M _w (10 ⁶ g.mol ⁻¹)	N _{agg}
PEOPCL 5000-11000	80.6	72.8	1.11	192.0	12000
PEOPCL 5000-32000	41.5	48.9	0.85	17.4	465
PEOPMMA 1400-5600	79.6	73.6	1.08	4.3	929
PEOPCL 2000-7000	n.d.	105.4	-	207.5	23000

Tableau II-8 : Caractérisation des différents objets par DLS et SLS

Pour les polymères du Tableau II-8, les objets observés présentent des diamètres allant de 80 à 160 nm, et la forme est sphérique, à l'exception de PEOPCL 2000-7000 de forme allongée. La taille trouvée pour PEO-PMMA 1400-5600 est proche de celle mesurée en TEM et AFM. Cependant, en TEM, une répartition large d'objets était visible, puisque des objets aussi petits que 20 nm étaient présents sur les images.

Le PEO-PCL 2000-4800 n'est quant à lui pas présenté dans ce tableau, car, à cause de sa nature de multi-population, il est extrêmement difficile à traiter en DLS et SLS, comme mentionné dans le chapitre 1.

Les R_g/R_h des PEO-PCL 5000-11000 et PEO-PMMA 1400-5600 montrent une morphologie de vésicules. Celui du PEO-PCL 5000-32000 se situe entre celui de vésicules (1.0) et celui des sphères homogènes (0.774).

Afin d'évaluer plus en détail leur forme, les données expérimentales ont été corrélées avec le facteur de forme de vésicules et des sphères de tous les systèmes sphériques. Les facteurs de formes utilisés sont présentés dans le Tableau II-9. Parmi les résultats nous présentons ici celui du PEO-PMMA 1400-5600 en Figure II-16 et celui du PEO-PCL 2000-7000 en Figure II-17. Sur ces figures sont présentées les points expérimentaux et les différentes corrélations obtenues. Dans le cas du PEO-PCL 2000-7000 un très bon fit est obtenu avec la forme de bâtonnet, ce qui confirme les résultats de TEM et AFM. Pour le PEOPMMA, le résultat est moins clair et le fit idéal n'est pas obtenu.

Forme	Facteur de forme P(q)
sphère	$9P \left(\frac{\sin qr - qrcosqr}{(qr)^3} \right)^2$
Vésicule	$P \frac{\sin^2(qr)}{q^2 r^2}$
bâton	$A \frac{\pi}{qL} e^{-\frac{q^2 r^2}{4}}$

Tableau II-9 : Facteurs de formes utilisés

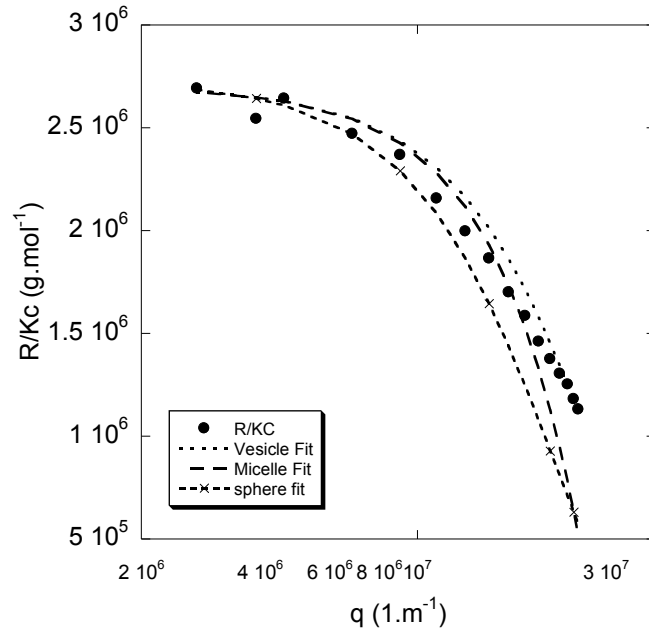


Figure II-16 : Facteur de forme proposé pour le PEO-PMMA 1400-5600

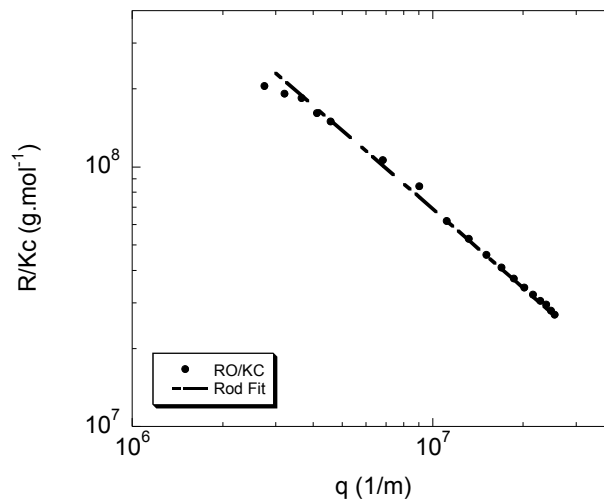


Figure II-17 : Facteur de forme du PEO-PCL 2000-7000

Il nous paraît aussi important de mentionner qu'il est possible de mesurer l'influence de A_2 et donc l'effet de concentration du PEO-PMMA qui y semblent sensibles par la relation entre Kc/R_θ en fonction de C . De fait, une forte évolution a été mesurée avec la concentration montrant une disparition progressive des agrégats en faveur d'objets unitaires avec la diminution de concentration.

Les mesures présentées dans le Tableau II-8 ont donc été faites à faible concentration, pour s'assurer de caractériser des objets unitaires et non des agrégats.

d. Analyse AsFFFF

L'analyse du PEO-PCL 2000-4800 a montré les limites des techniques d'analyse en batch lorsque plusieurs populations sont présentes. Une analyse fine des résultats SLS et DLS pourrait permettre un calcul corrigé quand une très faible quantité d'une autre population de plus grande taille est présente. Mais lorsque la quantité est non négligeable ou que plus de deux populations sont présentes, il serait erroné de tenter d'analyser un tel échantillon en SLS ou DLS.

Il faut donc une méthode d'analyse qui permette de mesurer toutes les populations et leurs proportions. Et pour cela le plus simple reste encore de séparer les différentes populations avant analyse. D'où l'intérêt de l'AsFFFF.

Contrairement au cas des micelles pour lesquelles des études antérieures de notre équipe avaient établi le programme d'élution, aucune caractérisation n'avait encore été faite pour les polymèresomes. Dans une première étape, le programme d'élution a donc dû être établi. Pour cela, le principe a été d'évaluer en premier sur PEO-PCL 5000-11000 le taux de recouvrement en injectant des quantités différentes de polymèresomes sans flux transversal. Dans ces conditions, 100% de la quantité injectée est récupérée. La surface du pic détecté par réfractométrie étant proportionnelle à la quantité injectée, une courbe d'étalonnage (Figure II-18) peut être tracée.

Quand un flux croisé est appliqué, la masse récupérée est déterminée par la surface du pic RI, les résultats présentés dans la Figure II-18 montrent que le taux de recouvrement de $98,7 \pm 4,6\%$ est obtenu en appliquant un flux croisé de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ après l'injection de $20 \text{ }\mu\text{g}$ et $60 \text{ }\mu\text{g}$ de polymèresome.

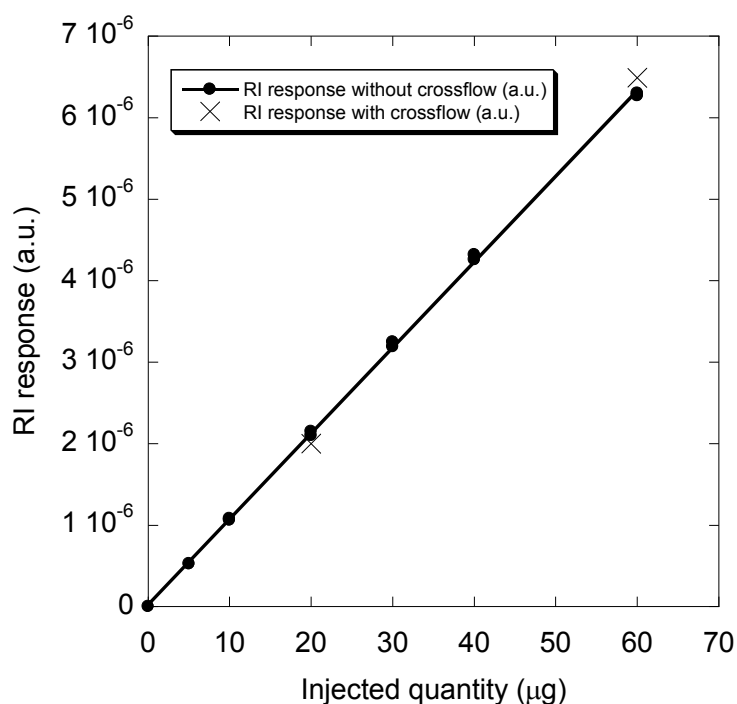


Figure II-18 : Taux de recouvrement du PEO-PCL 5000-11000

Après cette étape, les profils d'élution en fonction du flux croisé ont été examinés afin de déterminer le meilleur programme d'élution. Des exemples sont présentés dans la Figure II-19 pour PEO-PCL 5000-11000. Les conditions optimales recherchées devraient conduire à une bonne séparation du produit du pic d'élution (premier pic observé qui marque le début de l'élution) tout en évitant l'élargissement du pic de l'objet. Ceci a été réalisé ici avec un flux croisé de 0,4 mL.min⁻¹, ce qui a donc été choisi comme flux croisé pour les autres analyses pour être couplé avec un flux linéaire de 0.9 mL.min⁻¹

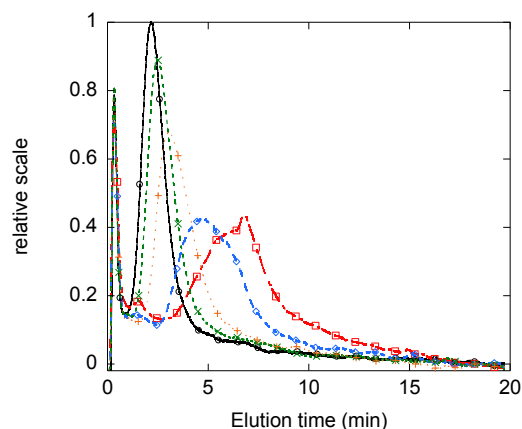


Figure II-19 : Profil d'élution du PEO-PCL 5000-11000 avec $V_c=0.9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et différent flux croisé : Noir $V_x=0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, vert $V_x=0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, Orange $V_x=0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, Bleu $V_x=0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, rouge $V_x=0.9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Une fois que les conditions d'élution ont été choisies, les différents polymèresomes PEO-PCL ont été caractérisés selon la même procédure. La Figure II-20 montre les fractogrammes obtenus et les caractéristiques des auto-assemblages en termes de masse molaire, nombre d'agrégation et de tailles sont présentées dans le Tableau II-10.

Sauf pour le PEO-PMMA 1400-5600, les valeurs de N_{agg} sont du même ordre que celles mesurées par batch SLS / DLS. Pour le PEO-PMMA 1400-5600, la différence provient de la présence d'agrégats évités dans le cas des SLS batch grâce aux dilutions.

Pour PEOPCL 2000-7000, les valeurs trouvées pour R_g et R_h sont du même ordre compte tenu de la forme de l'objet (bâton).

Pour PEOPCL 5000-11000, la taille obtenue (R_h) est du même ordre, mais il y a une différence sur la valeur du R_g conduisant à un rapport beaucoup plus élevé R_g/R_h déterminé par AsFIFFF. Cela pourrait être le signe d'un cisaillement des objets pendant l'élution dans le canal sous la contrainte du flux croisé ou simplement en se trouvant sur vecteurs de flux distincts (le flux laminaire imposant un cisaillement par nature).

Enfin PEOPCL 5000-32000 a donné des résultats similaires à la fois par l'analyse en batch et par AsFIFFF.

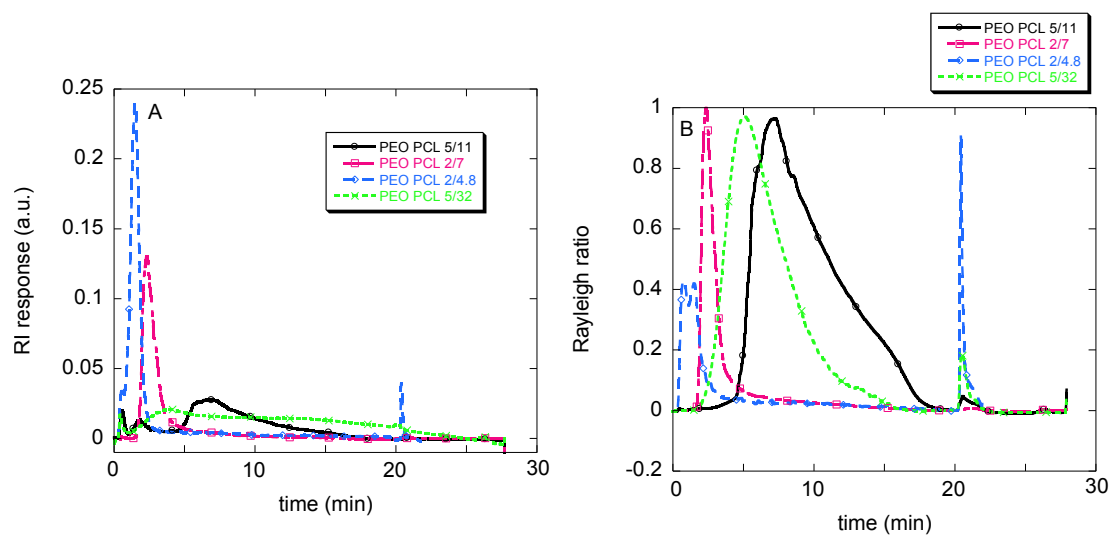
Pour ce qui est de la forme des pics, le système PEO-PCL 2000-7000 était clairement le mieux défini, les PEO-PCL 5000-11000 et 5000-32000 apparaissant comme des pics très larges. Ceci peut être comparé avec les images TEM où ces systèmes sont apparus comme polydisperses, mais ce résultat diffère de celui obtenu par DLS où PEO-PCL 2000-7000 avait l'indice de polydispersité le plus élevé.

Pour PEO-PCL 2000-4800, les conditions étudiées ($V_c = 0,9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $V_x = 0,4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) ne sont pas adaptées. En fait, même si une partie de l'échantillon a été fractionnée, une quantité importante a été balayée quand le flux croisé est arrêté après 20 minutes d'élution.

Par conséquent, une méthode d'analyse spécifique a été développée pour le fractionnement de cet échantillon en utilisant un écoulement transversal décroissant de façon linéaire : V_x décroissance linéaire de $0,5$ à $0,15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à 5 min ; $V_x = 0,15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 15 min (Figure II-21)

Polymère	R_{gw} (nm)	R_{Hw} (nm)	R_g/R_H	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	N_{agg}	I_p
PEO-PCL 2000-4800	40/159/154	40/135/230	n.d.	2 300 000 - 570 000 000	2 200 000 - 590 000 000	340-84000	n.d.
PEO-PCL 2000-7000	112.0	68.0	1.65	130 000 000	140 000 000	15 000	1.02
PEO-PCL 5000-11000	143.7	66.0	2.18	1 050 000 000	1 450 000 000	65 000	1.38
PEO-PCL 5000-32000	46.0	60.5	0.76	31 000 000	72 000 000	820	2.32
PEO-PMMA 1400-5600	180.0	284.0	0.63	330 000 000	560 000 000	71 000	1.70

Tableau II-10 : Analyse RI-MALS après séparation par AsFIFFF



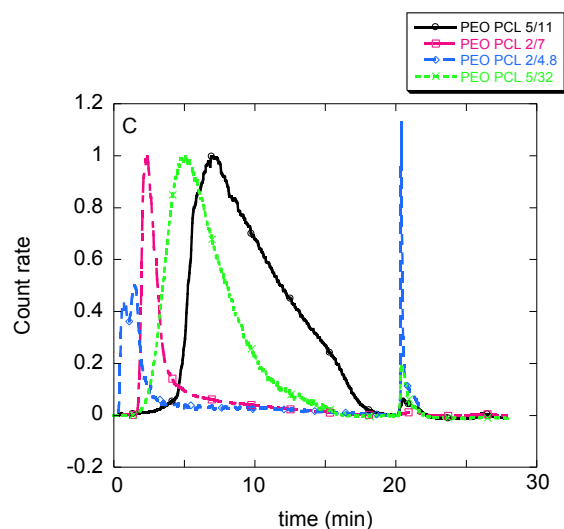


Figure II-20 : analyse AsFIFFF des polymèresomes PEO-PCL. A, Signal RI, B, signal MALS, C, Signal QELS

Le PEO-PCL 2000-4800 montre clairement trois populations distinctes d'objets avec un pic de 2 à 3.5 minutes, un pic de 3.5 à 6 minutes et un pic entre 6 et 8 minutes. Ces trois différentes familles possédant des R_h allant de 30 à 230 nm, il est impossible de les caractériser en DLS classique. Il est toutefois intéressant de noter que cet échantillon conduisait parfois en analyse DLS à une polydispersité très faible de 0,07.

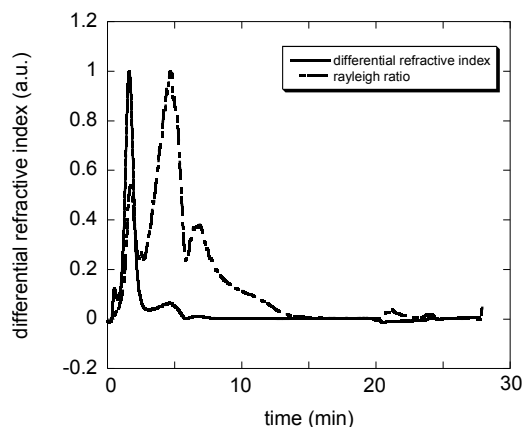


Figure II-21 : Analyse AsFIFFF du PEO-PCL 2000-4800

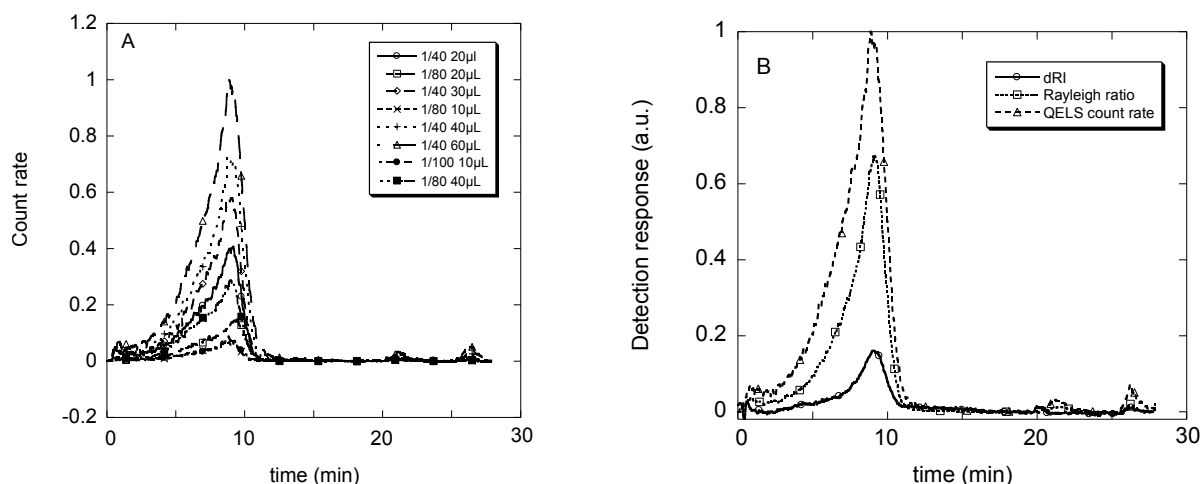


Figure II-22 : Analyse AsFIFFF du PEO-PMMA 1400-5600, A, QELS, B RI, MALS et QELS

Pour finir les analyses AsFIFFF présentées dans ce chapitre, le PEO-PMMA 1400-5600 a également été analysé en utilisant un flux croisé de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, afin d'avoir une vue d'ensemble complète du système. Le fractogramme montre une seule population ayant un pic dissymétrique (Figure II-22) entre 2 et 11 minutes avec un maximum à 9 minutes, ceci est souvent signe d'objets très polydisperses et dont les différents fragments ne sont pas représentés en nombre égal, ou d'agrégats.

Cependant les solutions ont dû être diluées afin d'éviter la saturation des détecteurs SLS (MALS). La dissymétrie du pic restant pour les solutions diluées, cette dissymétrie est due à une solution polydisperse plutôt qu'à une injection en trop grande quantité d'échantillon (phénomène d'overloading). Le K_c / R_θ observé à chaque condition d'angle et d'injection n'a pas varié (Figure II-23), ce qui signifie que, dans ces conditions, la présence d'agrégats a été évitée autant que possible. la dissymétrie du pic pourrait donc venir d'une distribution d'objets non gaussienne.

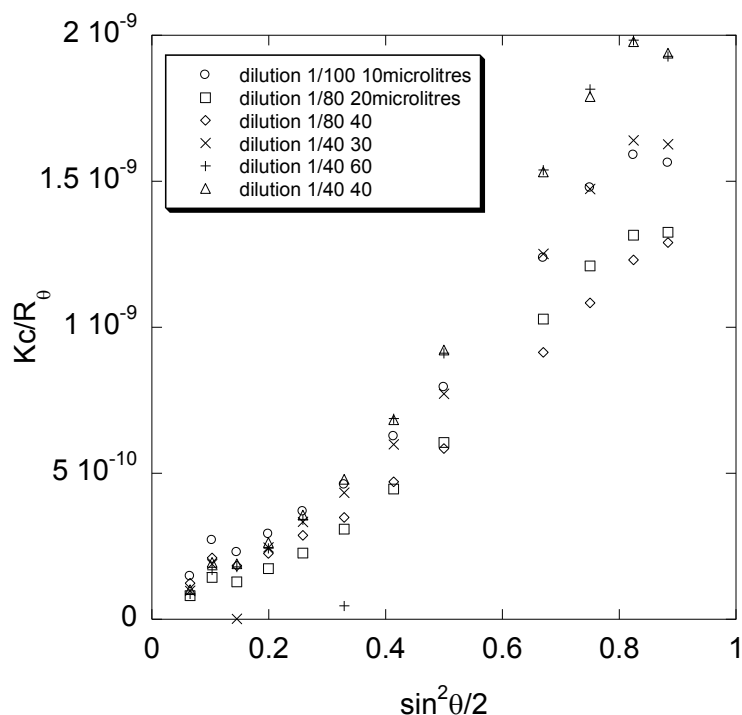


Figure II-23 : Etude du Kc/R_θ pour le PEO-PMMA 1400-5600 à partir du MALS après séparation par AsFFFF

e. Comparaison des méthodes

À ce stade, il convient d'avoir une analyse plus approfondie de la méthode d'évaluation de la polydispersité des auto-assemblages. Le Tableau II-11 présente un aperçu des différentes techniques utilisées dans cette étude.

Pour l'analyse TEM, la polydispersité peut être évaluée à partir du rapport entre l'écart type et la valeur mesurée de la taille. Cela permet une comparaison entre les échantillons montrant que PEO-PCL 5000-11000 et 5000-32000 présentent une dispersion proche, tandis que PEO-PMMA est nettement plus polydisperse.

Les expériences AsFFFF donnent deux détails différents. Tout d'abord, en utilisant la même méthode d'élution, la comparaison du profil donne une information rapide de la différence en nombre de la population, la taille et la dispersion en taille entre chaque auto-assemblage. En dehors de PEO-PCL 2000-4800 présentant plusieurs populations distinctes, PEO-PCL 5000-11000 et 5000-32000 se comportent de façon similaire, tandis que le PEO-PCL 2000-7000 a une durée d'élution très courte.

Pour les expériences de diffusion de la lumière, les PDI obtenus sur un instrument Malvern sont rapportés et ont été évalués à partir de la déviation par rapport au modèle monomodal. Ceux-ci donnent des résultats proches par rapport à la TEM. Sur cette mesure, il est important de mentionner que PEO-PCL 2000-4800 a donné des résultats erratiques pour le PDI, compris entre 0,07 et 0,43, selon les lots. Cela montre clairement qu'il ne faut pas utiliser une seule mesure d'une telle solution pour évaluer la polydispersité du système.

Enfin, le PDI a également été calculé sur le système ALV de DLS/SLS simultanées pour chaque expérience. Pour cela, le PDI correspond au carré du rapport écart type / valeur moyenne du Rh pour les différentes solutions avec différentes concentrations et à différents angles. Ceci est donc différent du PDI évalué sur l'instrument Malvern et fournit des informations sur la répétabilité de la mesure elle-même plus que la présence de plusieurs populations dans la solution.

Polymère	TEM Résultat d'analyse ^a	PDI ALV ^b	PDI Malvern ^c	Durée d'élution AsFIFFF (min)	Ip (AsFIFFF)
PEO-PCL 2000-4800	-	n.d.	0.07-0.43	-	-
PEO-PCL 2-7	-	n.d.	0.22	4	1.02
PEO-PCL 5000-11000	62.6 ± 28.1 nm (0.19)	10 ⁻⁴	0.17	13	1.38
PEO-PCL 5000-32000	39.9 ± 15.9 nm (0.16)	4 10 ⁻⁴	0.10	13	2.32
PEO-PMMA 2-2.6	121 ± 77 nm pour les unimères (0.41)	2.5 10 ⁻³	0.23	-	1.7

Tableau II-11 : PDI obtenu par différentes méthodes ^aLa valeur entre parenthèses correspond au rapport (SD / taille) ². ^bcalculé à partir SD² / (valeur moyenne) ² sur différentes concentrations. ^c calculé à partir de la déviation de forme du cumulant

D'un point de vue général, cette analyse permet de tirer différentes conclusions. Si la même tendance peut parfois être trouvée par plusieurs techniques, il faut être très prudent et ne pas limiter l'analyse à une seule technique. Le PDI fourni par la DLS Malvern (écart cumulant) devrait également être pris avec beaucoup de soin, car, dans cet exemple, le PEO-PCL le mieux défini 5000-32000 en DLS se trouve être le plus large en AsFIFFF pour l'Ip. Cependant, le changement possible de la forme pendant l'élution peut induire des erreurs dans la détermination de la masse molaire et donc à celle de Ip.

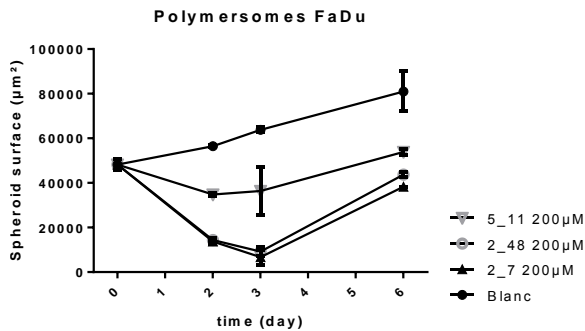
f. Effet biologique en PDT

Nous avons ensuite placé différents polymèresomes au contact des sphéroïdes et suivi leur évolution comme nous l'avons fait avec les micelles précédemment.

Il est important de noter aussi que tous ces objets ont été passés sans charge de phéophorbide et à différentes concentrations. Nous avons fait le choix de montrer uniquement les objets à 100µM de polymère dans le milieu donc 3.3µM de Phéo et à 200µM de polymère donc 6.6µM de Phéo, sauf dans le cas des PEO-PMMA (Figure II-24) où nous montrerons toute l'expérience menée.

Le traitement à l'aide de différents polymèresomes de PEO-PCL a donc été mis en place à deux concentrations (Figure II-24).

Sphéroïdes FaDu



Sphéroïdes HCT 116

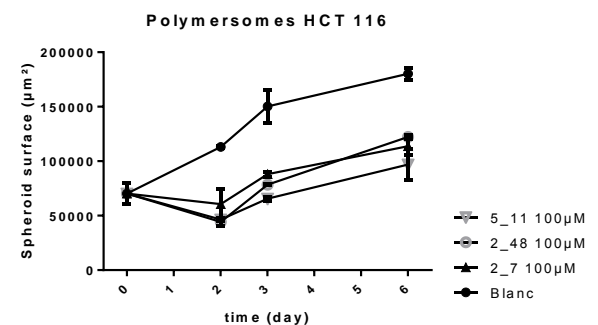
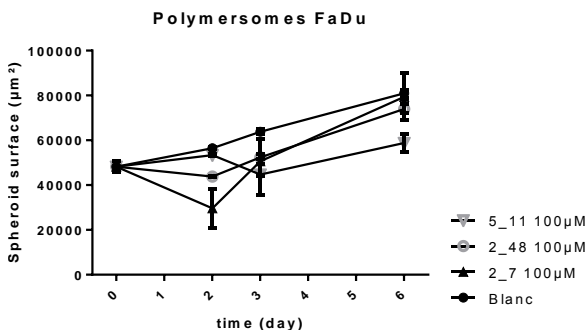
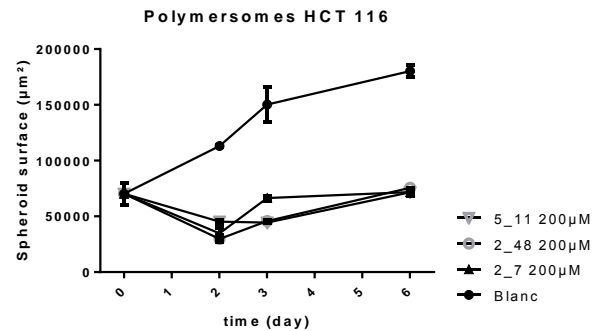


Figure II-24 : Taille des sphéroïdes après traitement PDT en utilisant les polymèresomes PEO-PCL [Polymère]/[Phéo]=30

A 200µM de polymère, le traitement est très efficace, que ce soit dans le cas des FaDu ou des HCT-116. Cependant dans le cas des FaDu on distingue deux groupes d'objets. Le premier est composé du PEO-PCL 5000-11000, polymèresome classique et sphérique bien défini bien que légèrement polydisperse. Peu efficace, il maintient le sphéroïde à une taille à peu près constante, bien qu'il soit sujet à un renouveau de croissance après la fin des illuminations comme toujours. Cette croissance s'explique facilement quand on connaît la réaction des cellules au stress appliqué.

Le second groupe d'objet est composé du PEO-PCL 2000-7000, les objets oblongs, et le PEO-PCL 2000-4800 l'amas de trois familles d'objets différents indifférenciés. Or depuis toujours dans la littérature les gens ne s'intéressent pas à ces objets qui ne sont que très peu décrits. Nous observons dans ce cas que l'assemblage de différentes familles de polymèresomes est au moins aussi efficace que ceux purs. Ceci pourrait même être lié à un effet de synergie entre les morphologies présentes.

Dans le cadre des HCT 116 à cette même concentration et à celle deux fois inférieure, nous observons un seul et unique fuseau non différenciable statistiquement mais toujours efficace.

Le cas des FaDu à 100µM de polymères (3,3µM de Phéo) est un peu particulier car il est très compliqué de sortir un polymère du lot, et ce même du blanc. Le PEO-PCL semble efficace au jour 2 mais la croissance du sphéroïde traité est telle qu'elle rejoint le blanc après coup. Au jour 4, soit deux jours après la fin du traitement, aucun sphéroïde n'est différenciable de celui non traité.

4. Conclusion générale

Plusieurs points cruciaux ont été abordés dans ce chapitre :

Nous avons montré qu'il est nécessaire de coupler différentes analyses pour pouvoir différencier les objets qui possèdent de multiples populations ou pour affiner l'analyse, en particulier pour le PDI. Nous avons de plus montré la capacité d'analyse de l'AsFIFFF pour différentes micelles et d'autres auto-assemblages comme les polymèresomes. Les fractogrammes obtenus avec l'AsFIFFF sont très instructifs sur la différence de composition entre plusieurs échantillons et donnent d'abord des informations sur les différentes tailles. L'association de l'AsFIFFF avec des détecteurs de diffusion de la lumière donne des informations complémentaires aux analyses en batch de diffusions dynamique et statique de la lumière, de la microscopie électronique et de l'AFM. La technique AsFIFFF-MALS-QELS-RI est particulièrement pertinente lorsque les échantillons sont complexes par exemple en présence de plusieurs populations.

Nous avons aussi montré l'importance du vecteur, que ce soit du point de vue du traitement, où le changement de vecteur impacte grandement sur l'efficacité en PDT, ou de son interaction (par sa taille et sa forme) avec les cellules.

Enfin nous avons montré que certains objets que l'on pourrait croire inefficaces sont prometteurs et ne peuvent être écartés sans un test sur les sphéroïdes car les tests en deux dimensions sont incomplets comme nous l'aborderons dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Réticulation

III. Réticulation

1. Introduction

La réticulation est un procédé courant dans le domaine des polymères qui consiste à lier plusieurs chaînes polymères dans un réseau 3D. Elle est très utilisée dans le domaine des caoutchoucs ou des matrices de matériaux plastiques, mais très peu dans le domaine de la vectorisation car les procédés utilisés sont souvent toxiques si injectés dans le corps humain, et la réticulation d'un objet a tendance à ralentir la diffusion du médicament en dehors du vecteur. Cependant et pour cette même raison, certains de ces procédés de réticulation sont utilisés dans les matrices implantées [136] dans le but d'une diffusion plus lente mais qui vient admettre des difficultés différentes tel que l'effet de burst (relargage rapide d'une grande quantité de médicament encapsulé dans des temps courts).

Les micelles de copolymères précédemment décrites sont des objets auto-assemblés. Aucune liaison chimique n'existe entre les différentes chaînes de polymères. Grâce à leur stabilité cinétique, ces objets sont tout à fait utilisables pour la vectorisation et ont permis d'obtenir de nombreux résultats. Dans le cadre de notre projet, la stabilité de ces micelles a été évaluée à environ 15 jours à 37°C en solution aqueuse. En présence de sérum de veau fœtal, cette stabilité diminue à quelques jours en moyenne [274]. La réticulation de ces objets a d'abord été envisagée afin d'améliorer leur stabilité sur un plus long terme.

Comme décrit dans le chapitre bibliographique, plusieurs auteurs ont prouvé que des vecteurs réticulés avaient une meilleure efficacité comparée à leurs homologues simples lorsque cette dernière était comparée *In-Vivo*.

Ainsi les objets réticulés continuent à être étudiés, et peuvent être étudiés avec des modèles 3D de types sphéroïdes car ils mettent en œuvre deux formes de diffusion dans les tumeurs, les intra et les intercellulaires. Dans ce cas là, un relargage plus régulé et lent du principe actif par le nano-objet peut être d'un grand intérêt permettant ainsi de toucher toutes les couches des cellules et non seulement la première couronne [275].

Nous avons donc étudié des objets réticulés sur deux aspects, le premier consiste à constater les effets en fonction de la différence de degré de réticulation, et le second d'observer la différence entre la culture deux dimensions et la culture trois dimensions : ici des sphéroïdes. Nous nous attacherons donc à ces deux points dans ce chapitre.

2. Formation des micelles réticulées

Dans l'optique de mise en place de ces différences il nous a fallu créer en premier lieu des objets pouvant être réticulés ou polymérisés entre eux. Nous avons choisi de nous fonder sur l'étude de Kataoka [114] autant pour la simplicité de sa réaction que pour l'objet final qui n'ajoutait que peu de toxicité et ne perturbait pas les intérêts de la polycaprolactone. Nous avons donc greffé un groupement acrylate à différentes chaines PEO-PCL par réaction d'estérification entre le groupement hydroxyl terminal du bloc PCL et le chlorure d'acryloyle (Figure III-1). Trois tailles de chaines ont été utilisées :

- Les PEO-PCL 2000-2800 et PEO-PCL 5000-4000 qui forment des micelles d'une vingtaine de nanomètres de diamètre.
- PEO-PCL 2000-7000 formant des objets allongés ou worm-like.

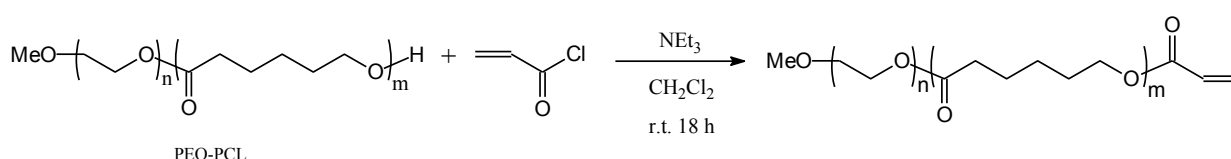


Figure III-1 : Accrochage du groupe acrylate

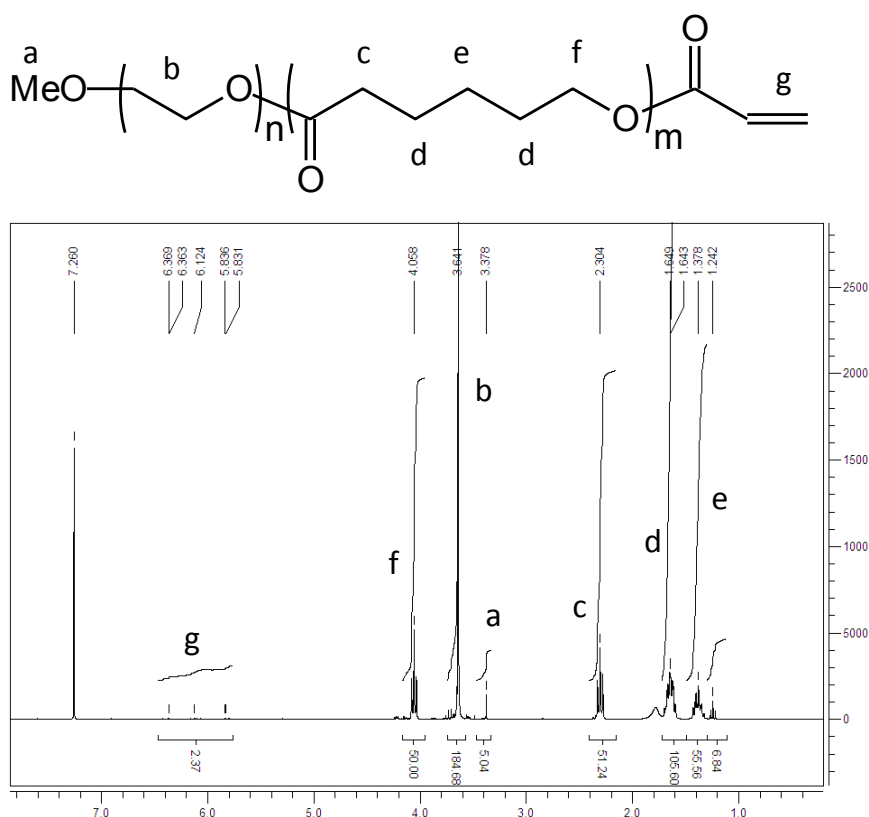


Figure III-2 : Spectre RMN ^1H du PEO-PCL après greffage de l'acrylate dans du CDCl_3

Le taux d'acrylation (Tableau III-1) est déterminé par RMN ^1H dont un exemple est présenté en Figure III-2 grâce au signal du proton à 6ppm .

	PEO2000-PCL7000	PEO5000-PCL4000	PEO2000-PCL2800
Fonctionnalisation en acrylate	90%	60%	90%

Tableau III-1 : Taux d'acrylation des différents polymères

On obtient des taux d'acrylation de 90% pour les PEO-PCL 2000-7000 et 2000-2800. Pour le PEO-PCL 5000-4000, le taux de fonctionnalisation est plus faible à 60%. Cette gamme de fonctionnalisation est comparable à ce qui est décrit dans la littérature, avec des taux aussi bas que 20% dans certains cas [276]. Dans le cas où la réaction est effectuée comme ici dans un bon solvant pour les deux blocs, un taux de fonctionnalisation plus faible peut provenir d'un défaut de fonction hydroxyle de la chaîne polymère de départ. Une étude par spectrométrie de masse MALDI aurait permis de confirmer ce point.

Les différents objets sont ensuite assemblés puis la fonction acrylate est polymérisée en présence ou en absence d'un agent réticulant, l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA).

En son absence, les chaînes de PEO-PCL sont simplement polymérisées entre elles dans le but d'atteindre un objet qui pourrait s'ouvrir sous la forme d'un polymère peigne, et a ainsi un degré de résistance de l'objet moindre. Nous les appellerons ici Chain-end Polymerized ou polymérisé en bout de chaîne.

En présence d'EGDMA, une réelle réticulation (au sens premier du terme) aura pour effet de joindre les différentes fonctions acrylates et méthacrylates en formant un réseau polymère à l'intérieur de la micelle et empêchant théoriquement l'ouverture ou l'explosion de l'objet. Ces derniers seront appelés Crosslinked.

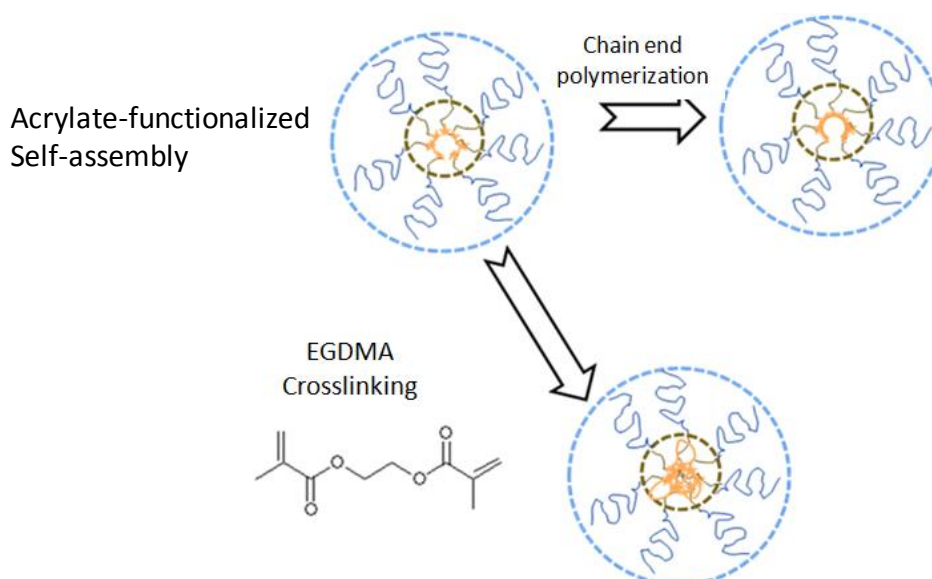


Figure III-3 : Différence entre polymérisation et réticulation

Les différents objets ont ainsi été soumis à différents amorceurs dans les mêmes conditions pour pouvoir différencier leur effet. Deux amorceurs thermiques ont été utilisés, ainsi qu'un couple redox et un amorçage à la lumière possible grâce au groupement acrylate. Les taux de conversion ont été déterminés par RMN ^1H avec la disparition du signal des protons à 6 ppm (Figure III-4). Les différents résultats sont présentés dans le Tableau III-2.

Amorceur	taux de conversion obtenu par RMN ^1H
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (50°C)	27%
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 / \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Tamb)	14%
AIBN (50°C)	23%
chauffage (50°C)	37%

Tableau III-2 : Conversion du PEO-PCL 2000-2800-acrylate avec différents amorceurs

Une différence notable entre les amorceurs a été observée. Il est de fait que la réticulation à température ambiante semble ineffective, et que la réticulation la plus efficace est celle d'un objet simplement chauffé sans amorceur. Le faible taux de polymérisation obtenu en présence d'amorceurs peut être expliqué par la partition entre la phase aqueuse et l'intérieur de la micelle de ceux-ci. Dans la littérature [277, 278] pour limiter cet effet, des mélanges de solvants sont souvent utilisés pour la polymérisation des micelles mais ces mélanges, en plus d'induire une toxicité difficilement contrôlable nécessitant de nombreuses étapes de purification ou de dialyse, peuvent changer la morphologie des micelles. Une autre explication possible suggérée par Kissel et al. pour l'obtention de meilleurs résultats en l'absence d'amorceurs est reliée à la semi-cristallinité du bloc polycaprolactone [278], ce qui conduit à un accès et une mobilité limités des molécules réactives à l'intérieur des micelles. Une alternative a été donnée par Kataoka et al. qui a utilisé un amorceur plus hydrophobe que l'AIBN, à savoir l'azobis diméthylvaléronitrile [277]. Visant une application biologique, nous avons décidé qu'il était préférable d'éviter l'ajout d'un nouveau composé chimique éventuellement toxique. Par conséquent, nous avons choisi le protocole le plus simple de chauffage sans amorceur chimique, bien que le rendement puisse ne pas être optimal.

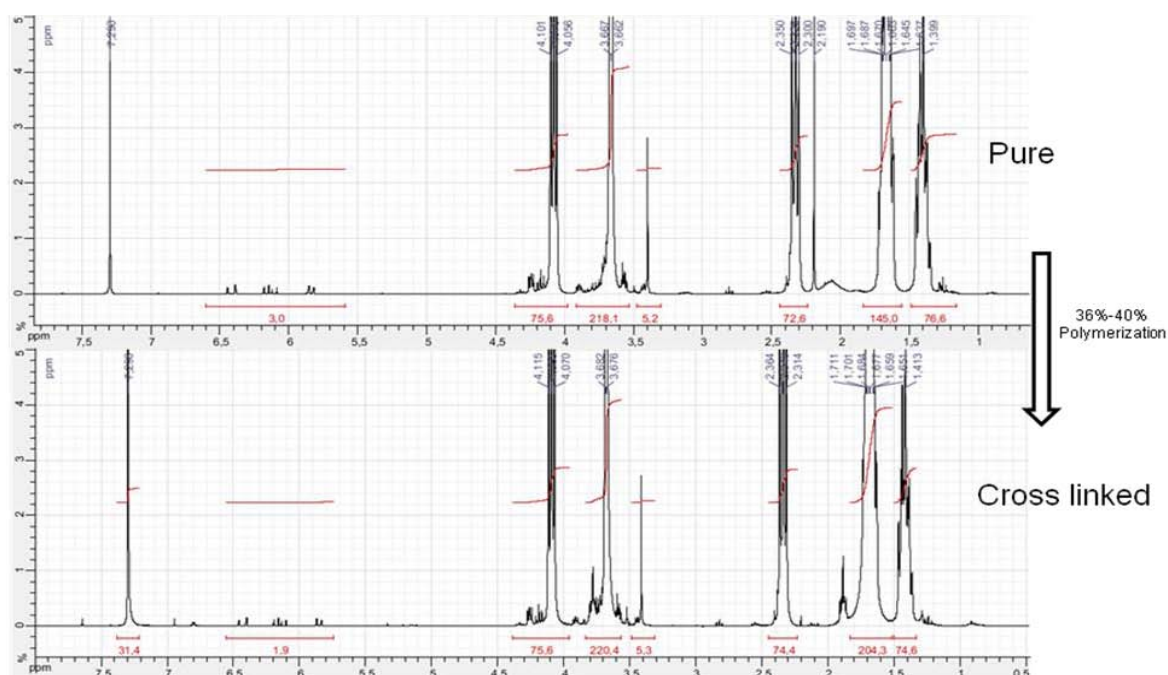


Figure III-4 : RMN ^1H d'un auto-assemblage de PEO-PCL avant et après réticulation

Le protocole de simple chauffage à 50 ° C a donc été choisi pour induire la réaction de l'acrylate de tous les systèmes auto-assemblés.

Comme indiqué au Tableau III-3, la meilleure conversion a été obtenue en présence d'EGDMA ajouté en deux séquences, ce qui conduit à des conversions de 60 à 75%. Il est à noter que, pour PEO-PCL 2000-7000, une conversion partielle d'acrylate était déjà présente lors de la préparation de l'auto-assemblage, en raison du processus de formation des objets impliquant le chauffage à 65 ° C pendant quelques heures.

Conversion des fonctions acrylates %	PEO2000-PCL7000	PEO5000-PCL4000	PEO2000-PCL2800
Après auto-assemblage	20%	0%	0%
Réaction sans EGDMA	60%	40%	40%
Réaction avec 15 μL EGDMA	60%	30%	60%
Réaction avec 15 μL +15 μL EGDMA	75%	60%	70%

Tableau III-3 : Taux de réticulation obtenu par RMN ^1H

Comme précédemment, ces rendements peuvent être expliqués par le fait que les acrylates sont greffés en bout de chaîne polymère et ont donc une mobilité réduite et ce même à 50°C, d'autant plus que le bloc polycaprolactone est semi-cristallin.

D'autres températures et d'autres temps de réticulations ont été testés dans le but d'optimiser la conversion et de pouvoir atteindre un meilleur éventail de nano-objets mais la plupart d'entre eux, transformant et déformant les micelles n'ont pu être choisis pour la suite des études et ne seront donc pas présentés.

Nous avons donc mis au point une méthode qui nous permet d'avoir divers degrés de réticulations sur nos objets, cependant leur morphologie se devait encore d'être vérifiée.

3. Analyse des objets

a. Analyse physico-chimique

Les objets ont ensuite été caractérisés en DLS et TEM (Tableau III-4 et Figure III-5). L'étape de réaction des fonctions acrylates n'induit aucune différence majeure que ce soit pour les objets PEO-PCL 2000-2800 ou les objets PEO-PCL 5000-4000 objets de même taille. L'analyse des objets PEO-PCL 2000-7000 par la DLS est à considérer avec précaution en raison de la forme non sphérique.

Polymère	Auto-assemblage	DLS Taille en Intensité. (nm)	DLS Taille en Nombre (nm)	PDI ^a	Taille moyenne à partir d'image TEM (nm)
PEO-PCL 2000-2800	Fonctionnalisé acrylate	12	9	0.28	10 ± 4
	Chain-end polymerized	15	10	0.37	16 ± 7
	Crosslinked/EGDMA	13	9	0.49	16 ± 4
PEO-PCL 5000-4000	Fonctionnalisé acrylate	25	17	0.36	18 ± 5
	Chain-end polymerized	24	19	0.22	n.d.
	Crosslinked/EGDMA	23	19	0.41	n.d.
PEO-PCL 2000-7000	Fonctionnalisé acrylate	73-305	45	0.44	30-500 de longueur 20 de large
	Chain-end polymerized	165	40	0.41	n.d.
	Crosslinked/EGDMA	400	105	0.41	30-800 de longueur 25 de large

Tableau III-4 : Caractérisation DLS et TEM des Nano-objets autoassemblés
^a, Indice de polydispersité

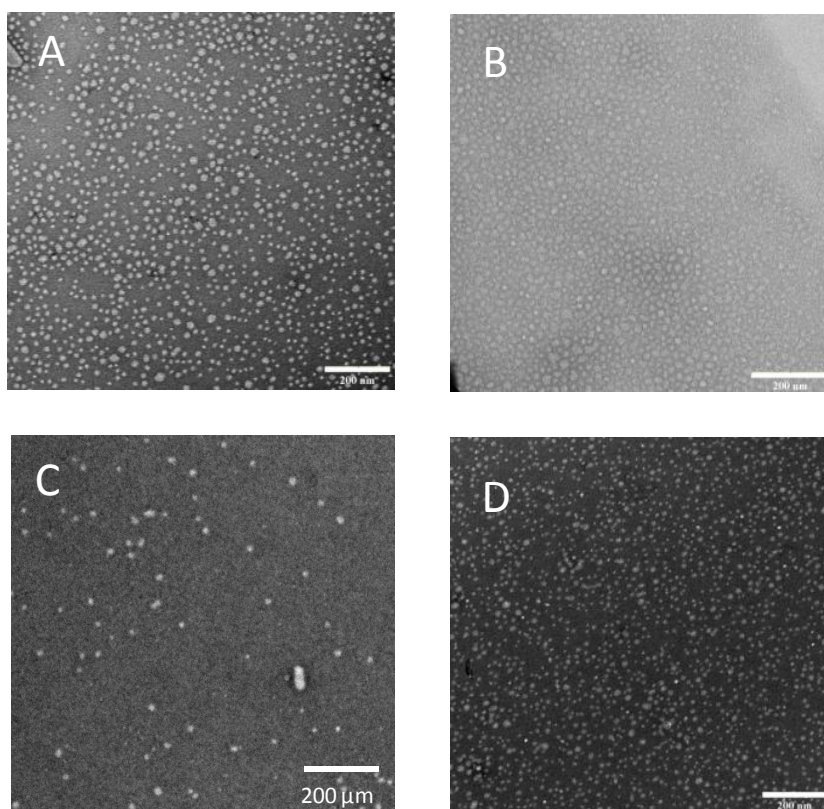
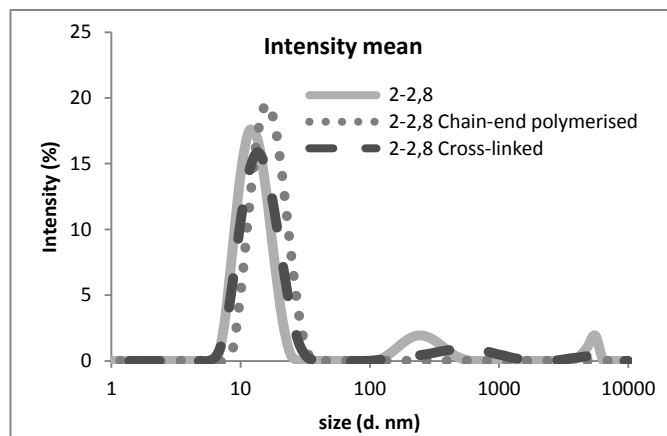


Figure III-5 : DLS et TEM typiques, cas de l'analyse du PEO-PCL 2000-2800. 2-2,8 représente le PEO-PCL 2000-2800. Pour la TEM, les barres d'échelles représentent 200 nm. A Micelles vides; B chain-end polymerized micelles; C crosslinked micelles; D Micelles chargées en Phéo

Comme pour les autres assemblages, ceux-ci ont été ensuite analysés par AsFIFFF suivant un protocole développé en annexe. Les résultats sont présentés dans la Figure III-6 ci-dessous.

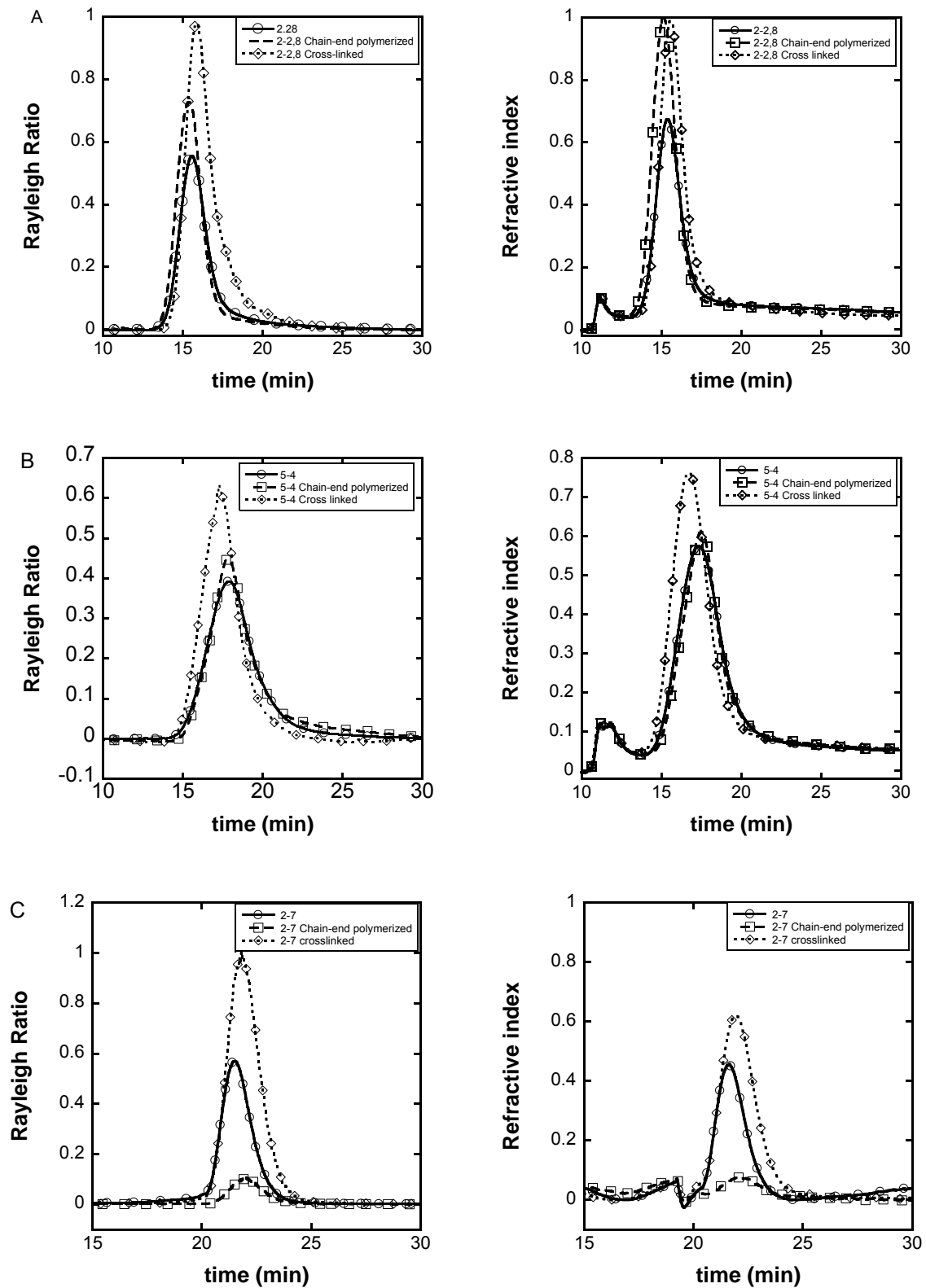


Figure III-6 : Analyse AsFIFFF d'objets auto assemblés vides. A: PEO-PCL 2000-2800; B: PEO-PCL 5000-4000; C: PEO-PCL 2000-7000. Dans les légendes, 2-2,8, 5-4 et 2-7 représentent respectivement PEO-PCL 2000-2800, PEO-PCL 5000-4000 et PEO-PCL 2000-7000

L'analyse AsFIFFF des objets est très claire et en corrélation avec la TEM et la DLS. Dans le cas du PEO-PCL 2000-2800, on observe un maximum de rétention à 16 min pour les détections réfractométriques et par le MALS pour les systèmes réticulés ou non. Bien que dans le cas du MALS le pic a un profil légèrement différent pour le système réticulé, ceci le temps de rétention ne varie que de 30 secondes, ce qui, dans ce cas là équivaut à une variation d'environ un nanomètre pour le maximum. Le signal RI quant à lui est identique pour tous les systèmes et ne montre aucune variation de temps de rétention. On peut donc en déduire que les micelles PEO-PCL 2000-2800 ne varient pas et restent une population unique de micelle quel que soit leur degré de réticulation.

Les PEO-PCL 5000-4000 suivent la même différenciation que le PEO-PCL 2000-2800 avec un maximum de rétention pour le MALS et le RI à 18 minutes pour les micelles acrylates et chain-end polymerized, et un maximum de pic à 17min pour le système réticulé avec EGDMA. Cette dissemblance est souvent vue dans différentes publications où l'objet est réduit en taille par la réticulation mais cette réduction, comme dans le cadre des PEO-PCL 2000-2800 reste minime bien qu'elle soit portée à la fois par le RI et le MALS. On peut donc en déduire que les micelles de PEO-PCL 5000-4000, comme attendu, restent aussi une unique population d'objets aux divers degrés de réticulation et ne varient pas en taille avec ceux-ci.

Dans le cas des PEO-PCL 2000-7000, il est d'autant plus intéressant de suivre cette possible variation par AsFIFFF que les autres méthodes sont rapidement limitées par la forme de l'objet qui n'entre pas dans les modèles classiques. On remarque ici une légère différence dans les temps de rétention des objets à 22min pour les auto-assemblages non réticulés, et à 23 min pour ceux après réaction, c'est-à-dire polymérisés (chain-end polymerized) ou réticulés à l'aide d'EGDMA (Cross linked). Cependant comme nous l'avons dit précédemment cette différence d'une minute est très faible en taille malgré le fait que la dissimilitude des méthodes employées implique une variation de taille plutôt de l'ordre de 5 nm à présent. Il n'en reste pas moins que la variation n'est pas très marquée et qu'aucune autre population n'apparaît avec la variation de degré de réticulation.

Polymère	Non réagi	Polymérisé	Réticulé
PEO-PCL 5000-4000	688	760	941
PEO-PCL 2000-2800	996	1020	1102
PEO-PCL 2000-7000	1x10 ⁶	1.8x10 ⁶	2.3x10 ⁶

Tableau III-5 : Evolution avec le niveau de réticulation des Mw (en kDa) obtenu par AsFIFFF

Dans le Tableau III-5 on observe l'évolution du Mw obtenu par analyse MALS après fractionnement par AsFIFFF. Ce dernier montre une évolution croissante avec le degré de réticulation. Cette analyse pourrait montrer une augmentation du nombre de polymère par objet dans ces cas là, ce qui semble très marqué pour le PEO-PCL 2000-7000 qui va jusqu'à doubler son nombre d'agrégation. Toutefois, il est important de relativiser cet effet, étant donné la forme allongée de ces vecteurs et donc le biais des mesures utilisant la diffusion de la lumière. Pour les micelles, le changement reste très faible en tenant compte des incertitudes du Mw. On obtient donc une très faible évolution du Mw

dans le cadre des micelles et une forte augmentation de ce dernier dans le cadre des PEO-PCL 2000-7000, la validité de cette observation étant à relativiser par rapport à la forme allongée des objets.

L'analyse en AsFFFF confirme donc les résultats TEM et DLS : les réactions de polymérisation des groupements acrylates ne modifient pas la morphologie et la taille des auto-assemblages formés.

b. Analyse de stabilité et relargage

Comme dans le chapitre précédent, la stabilité des auto-assemblages a tout d'abord été suivie par DLS (Figure III-7 a,b). Grâce à la réticulation, les objets ont montré une évolution beaucoup plus lente. Les objets sont capables de rester, après que le processus de polymérisation ou de réticulation ait été mis en place, trois mois voire plus sans subir de changement majeur. S'il apparaît un faible pic vers 300 nm c'est néanmoins très différent de ce que subissent des objets non réticulés dans le même temps. On n'observe d'ailleurs aucun changement de taille du pic principal. L'analyse en nombre quant à elle ne montre que le pic principal à 20 nm.

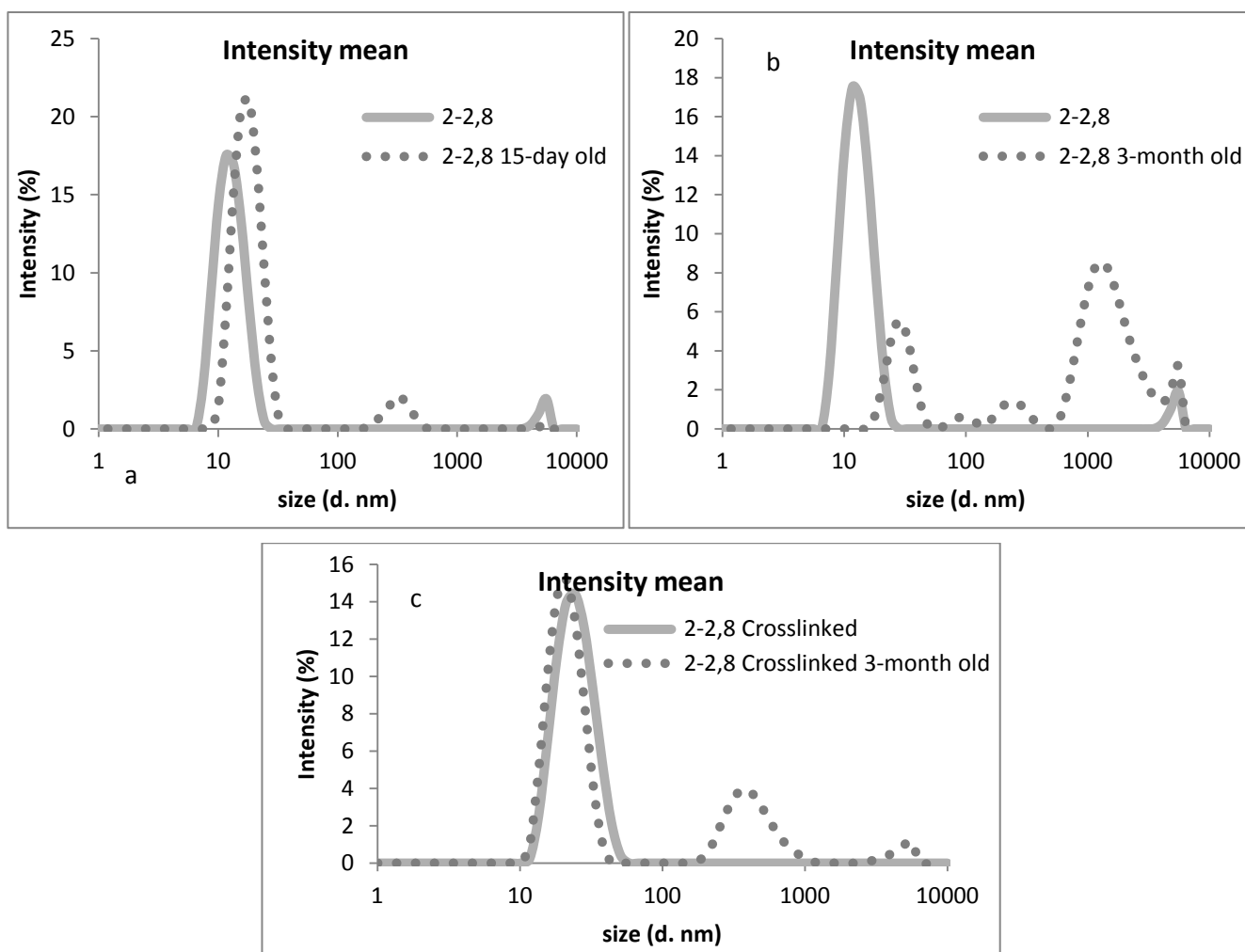


Figure III-7 : Analyse DLS retranscrite en intensité de différent degrés de réticulation de PEO-PCL 2000-2800 au cours du temps. a : micelle simple initiale et après 15 jours ; b : micelle simple initiale et après 3 mois ; c : micelle réticulée en présence d'EGDMA initiale et après 3 mois

On a donc, grâce à ce processus, une multiplication de la durée de vie des micelles de l'ordre de 6, ce qui est très intéressant pour la conservation ou la mise en œuvre d'un médicament ou d'une étude clinique.

Les assemblages allongés de PEO-PCL 2000-7000 avant réticulation sont pour leur part stables au moins 2 mois. Dans ce cas celle-ci n'amène donc pas de modification pertinente à ce point de vue.

Une autre des études couramment effectuées dans le cadre de la réticulation d'objet est la résistance aux changements de solvant. Ainsi une micelle réticulée est censée gonfler mais ne pas exploser lors de la mise en contact d'un bon solvant pour l'objet grâce au réseau 3D de ce dernier.

Dans notre cas, le THF a été choisi comme bon solvant pour les objets, autant pour le bloc poly(oxyde d'éthylène) que pour celui de polycaprolactone. Nous avons donc observé les micelles réticulées avec de l'EGDMA et les micelles non réticulées de PEO-PCL 2000-2800 et 5000-4000, dans différents mélanges de solvant Eau-THF. La Figure III-8 représente le coefficient d'extension de la micelle par rapport à sa taille initiale, en utilisant la distribution en nombre.

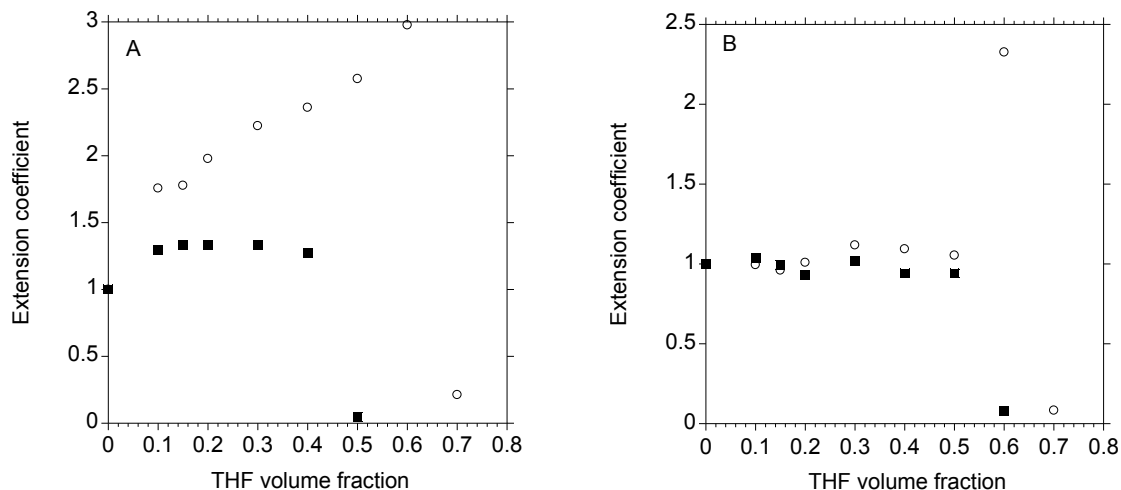


Figure III-8 : Analyse du coefficient d'extension des micelles non réticulées par rapport aux micelles réticulées dans un mélange de solvant Eau-THF, A PEO-PCL 2000-2800, B, PEO-PCL 5000-4000, o micelle simple; ■ micelle réticulée en présence d'EGDMA.

Contrairement à ce qui est courant dans la littérature il nous a été impossible d'observer de façon fiable les objets au dessus de 50%mol de THF qu'ils soient réticulés ou non. Il est à noter que déjà à 40% de THF tous les corrélogrammes montrent différentes populations ce qui rend l'analyse difficile. Pour le système PEO-PCL 2000-2800 on note une stabilité de la taille pour le système réticulé jusqu'à une fraction volumique en THF de 40%, alors que la micelle simple augmente de taille nettement dès le début de l'ajout de THF. En ce qui concerne PEO-PCL 5000-4000, on n'observe aucune différence claire de comportement, ce qui pourrait être attribué à la présence de zones cristallines grâce à une longueur de chaîne de PCL plus grande.

Le système PEO-PCL 2000-7000 a aussi été exposé au même traitement. Dans ce cas, les résultats sont plus difficiles à interpréter à cause de la forme allongée de l'assemblage (Figure III-9). La taille moyennée sur l'intensité des objets simples diminue de façon régulière alors que l'analyse en nombre reste stable. Ceci peut indiquer une évolution de la morphologie des objets. Quant aux objets réticulés, l'analyse en intensité, après une décroissance initiale, reste stable jusqu'à 60%. L'analyse en nombre quant à elle montre une taille qui chute vers 30%, là encore indiquant peut-être une évolution de morphologie.

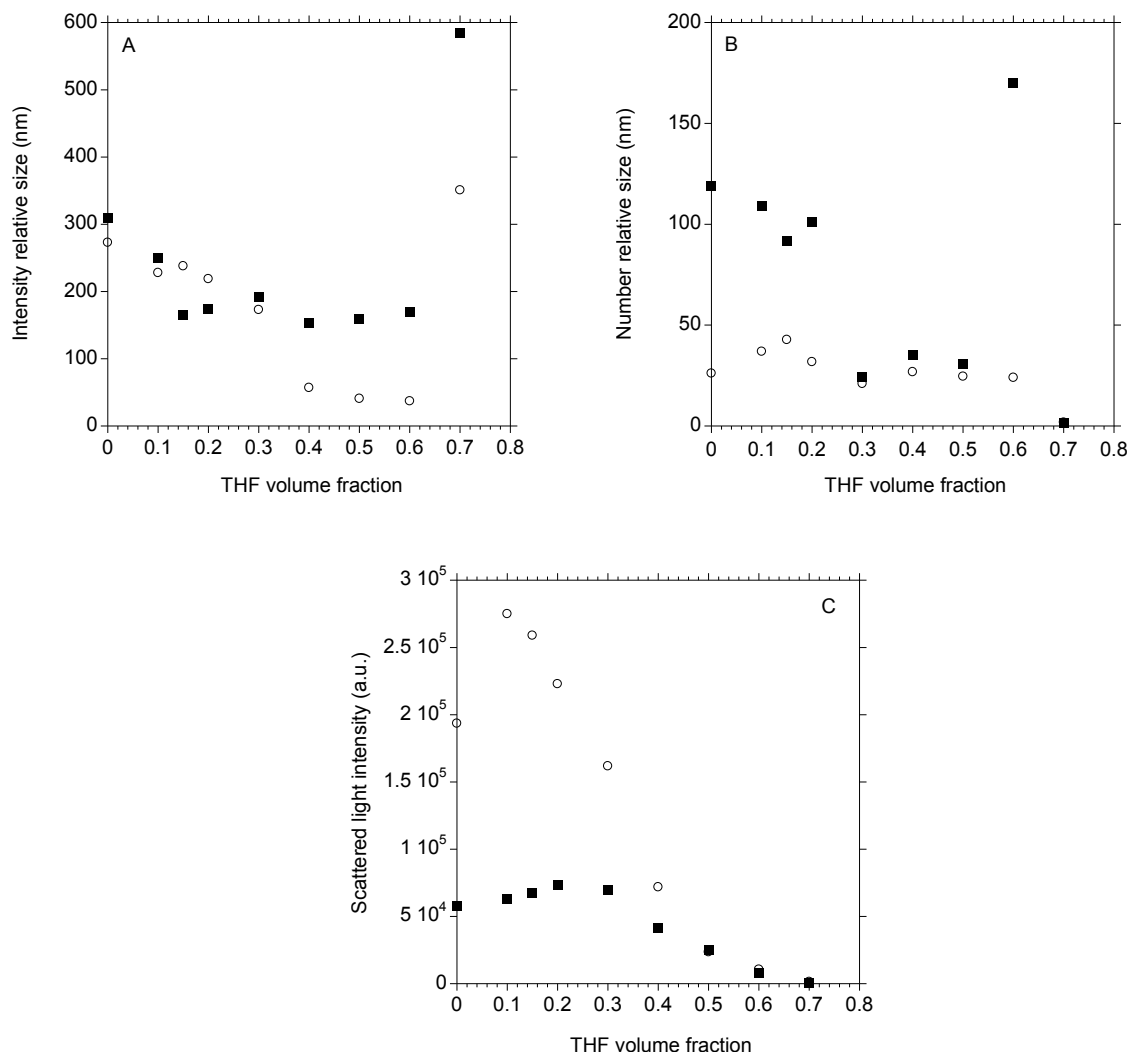


Figure III-9 : Influence du THF sur PEO-PCL 2000-7000. o micelle simple; ■ objet réticulé. A taille en intensité; B taille en nombre; C Intensité diffusée

Le plus intéressant du comportement reste la diffusion en intensité : une forte croissance est observée au début, surtout pour le système non réticulé, suivie par une rapide décroissance, cette forte décroissance peut être expliquée par la croissance et gonflement de ces worm-like en largeur, ce qui n'impacterait pas leur R_h principalement généré par leur longueur l mais aurait une forte influence sur l'intensité, ceci serait suivi par une décroissance rapide du nombre d'objet.

Ainsi, même si la résistance de ces objets peut paraître plus faible que celle observée dans la littérature, une différence de comportement est observée en présence de THF. Cette variabilité montre bien une réticulation, bien que partielle, ce qui est corrélé par l'analyse RMN 1H .

Une fois les objets vides formés et caractérisés, le Phéophorbide est ensuite chargé. Ce chargement a été effectué après la formation de l'objet dans le but d'éviter les problèmes de réaction

du phéophorbide avec les radicaux impliqués dans la réticulation. Pour ce faire, une petite quantité d'acétone chargée en phéo est introduite dans le milieu, puis la solution est laissée à l'air 48h afin de réduire la quantité d'acétone par évaporation. Le phéo se place durant cette période dans les micelles et aucune différence entre les objets post-chargés et les objets chargés à la création n'est discernable, ni en UV, ni en biologie.

En plus de la stabilité des auto-assemblages eux-mêmes, la cinétique de relargage a été testée à 37°C dans l'eau. On peut observer dans la Figure III-10 que la cinétique de relargage du Phéo n'est pas très différente entre les auto-assemblages réticulés ou non. Ceci diffère de la littérature qui nous indique un relargage plus lent dans le cas des objets réticulés que dans le cas des objets classiques. Cette différence de comportement peut être expliquée par la méthode de chargement utilisée. En effet, la plupart des études de la littérature procède au chargement en principe actif dès l'étape de formation de l'auto-assemblage. Ceci implique que celui-ci est déjà présent lors de l'étape de réticulation. Dans notre cas, le post-chargement encapsule le Phéo mais peut-être de façon moins profonde.

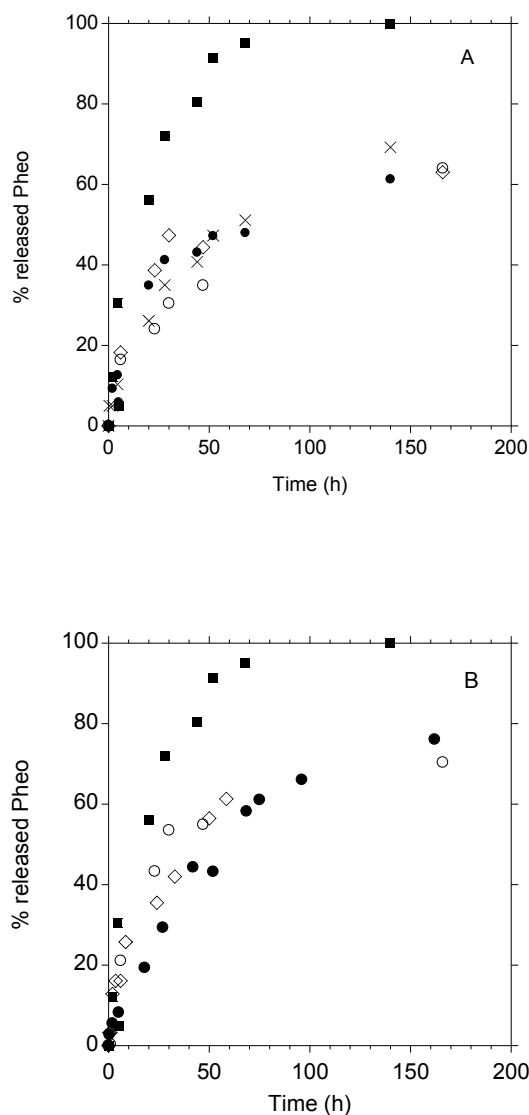


Figure III-10 : fuite du phéophorbide analysé dans l'eau à 37°C avec $[Phéo]_0 = 10^{-6} M$ en utilisant les auto-assemblages de PEO-PCL A. ■ Phéo seul, ● PEO-PCL 5000-4000/Phéo, ○ chain-end polymerized PEO-PCL 5000-4000/Phéo, ◇ PEO-PCL 5000-4000 réticulé /Phéo, x PEO-PCL 2000-2800/Phéo. B. ■ Phéo seul, ● PEO-PCL 2000-7000/Phéo, ○ chain-end polymerized PEO-PCL 2000-7000/Phéo, ◇ PEO-PCL 2000-7000 réticulé /Phéo

Globalement, les objets réticulés que nous avons obtenus permettent d'améliorer très nettement la stabilité dans le temps des assemblages micellaires, ceci malgré une réticulation partielle. Les réactions des acrylates ne modifient pas la morphologie ni la taille des assemblages, et la méthode de post-chargement en Phéo garantit une vitesse de relargage très proche des assemblages initiaux. Ils ont donc pu être ensuite évalués comme vecteur en PDT.

4. Comportement biologique

a. En culture 2D

Dans l'optique d'utiliser des polymères comme vecteurs, il est nécessaire de tester leur cytotoxicité. D'autant que les vecteurs actuels comportent un groupement acrylate, groupement pouvant à lui seul apporter une certaine cytotoxicité. La cytotoxicité des auto-assemblages chargés en Phéo a donc été évaluée en premier lieu dans l'obscurité sur la lignée cellulaire HCT-116 (cellules de cancer du côlon humain) (Figure III-11). Ainsi le but est de ne prendre en compte que la nocivité des polymères et du Phéophorbide non activé.

Deux concentrations pour les polymères ont été testées, à savoir 10 et 100 μM , ce qui correspond à la gamme utilisée pour les essais PDT. Comme prévu, les résultats ne montrent pas d'effet statistiquement significatif des nano-objets chargés en Phéo, ni pour le Phéo seul sans photoactivation suivant le test de Dunnett. Le PEO-PCL 5000-4000 polymérisé (chain-end polymerized) chargé en phéo est le seul qui a présenté une toxicité un peu plus élevée par rapport aux autres avec une différence statistiquement significative, mais cette dernière reste faible. Dans les expériences suivantes en 2D, la plus forte concentration de polymère utilisée étant de 50 μM (correspondant à $[\text{Phéo}] = 1,67 \mu\text{M}$) la légère toxicité dans l'obscurité de ce système est négligeable.

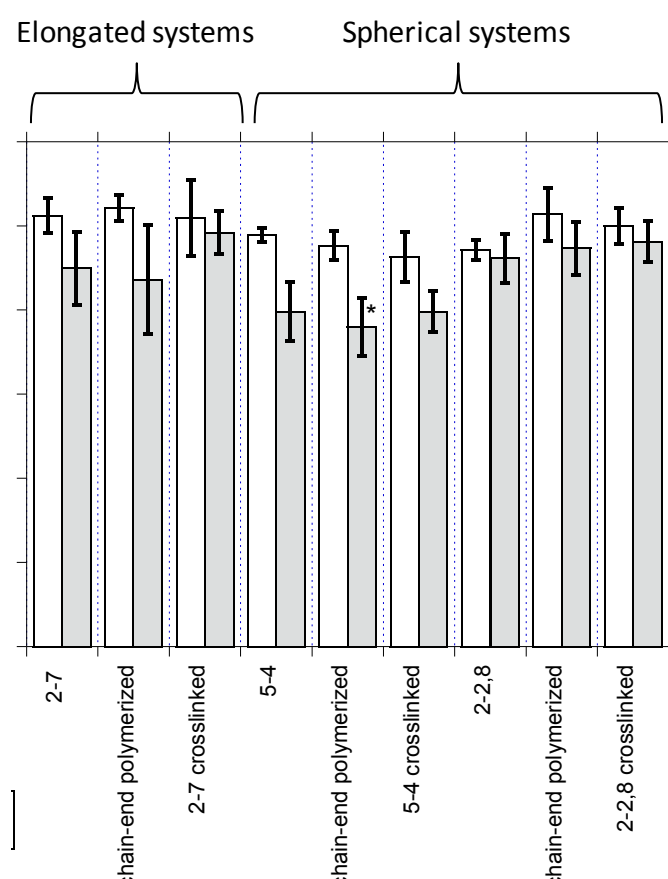


Figure III-11 : Cytotoxicité des auto-assemblages chargés en phéo ($[\text{Phéo}] / [\text{polymère}] = 1/30$) sur la lignée cellulaire 2D HCT-116 dans l'obscurité. La viabilité des cellules non traitées a été fixée à 100%. Les colonnes 2-7, 5-4 et 2-2,8 correspondent à des auto-assemblages formés avec des polymères acryliques fonctionnalisés.

Nous avons ensuite effectué un test de photocytotoxicité (avec illumination) 2D toujours sur la même lignée cellulaire (HCT 116) et avec un système 2D classique (Figure III-12).

Il convient d'observer d'abord l'inefficacité du Phéophorbide a non vectorisé, ce problème est bien connu et a été plusieurs fois observé. Il est à attribuer au π,π -stacking et à l'inactivation du Phéo dans les milieux aqueux, et ce malgré le nombre de protéines de transport du sérum qui sont présentes dans le milieu.

En second lieu on observe l'élimination totale des cellules aux fortes concentrations pour tous les vecteurs, qu'ils soient ou non réticulés.

Enfin la différence notable se trouve à une concentration en phéo de 0,0167 μ M: à cette concentration on observe un effet plus important pour les auto-assemblages n'ayant pas réagi que pour les objets ayant été polymérisés, qui eux mêmes ont moins d'effet que les vecteurs réticulés. Cela pourrait être attribué à un effet de rétention du médicament par la micelle réticulée comme indiqué dans différentes publications [275]. Cependant, dans notre cas aucune rétention n'a été détectée dans les dialyses à une concentration en phéo de 1 μ M entre les micelles simples et réticulées.

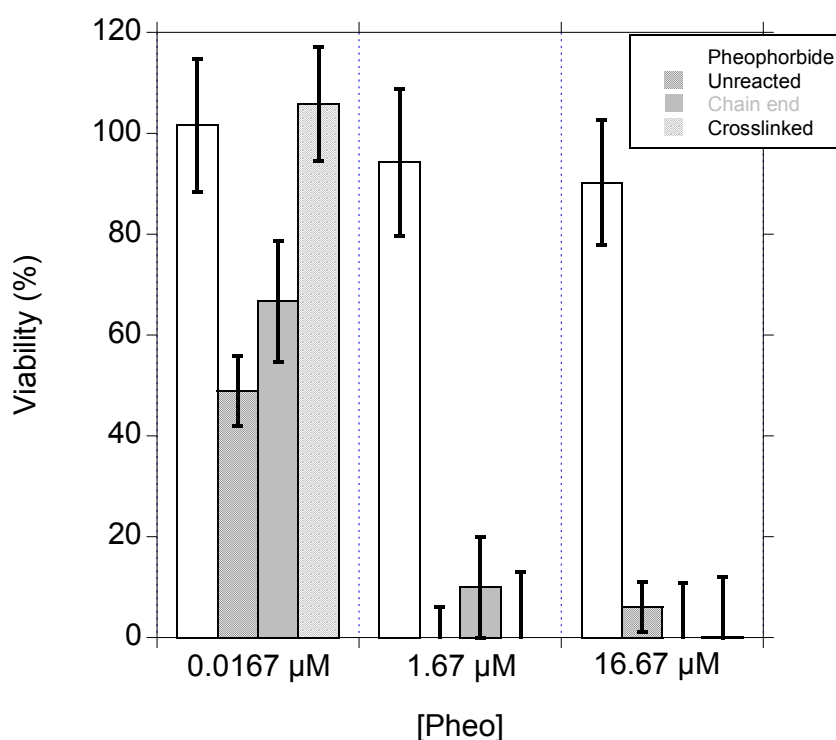


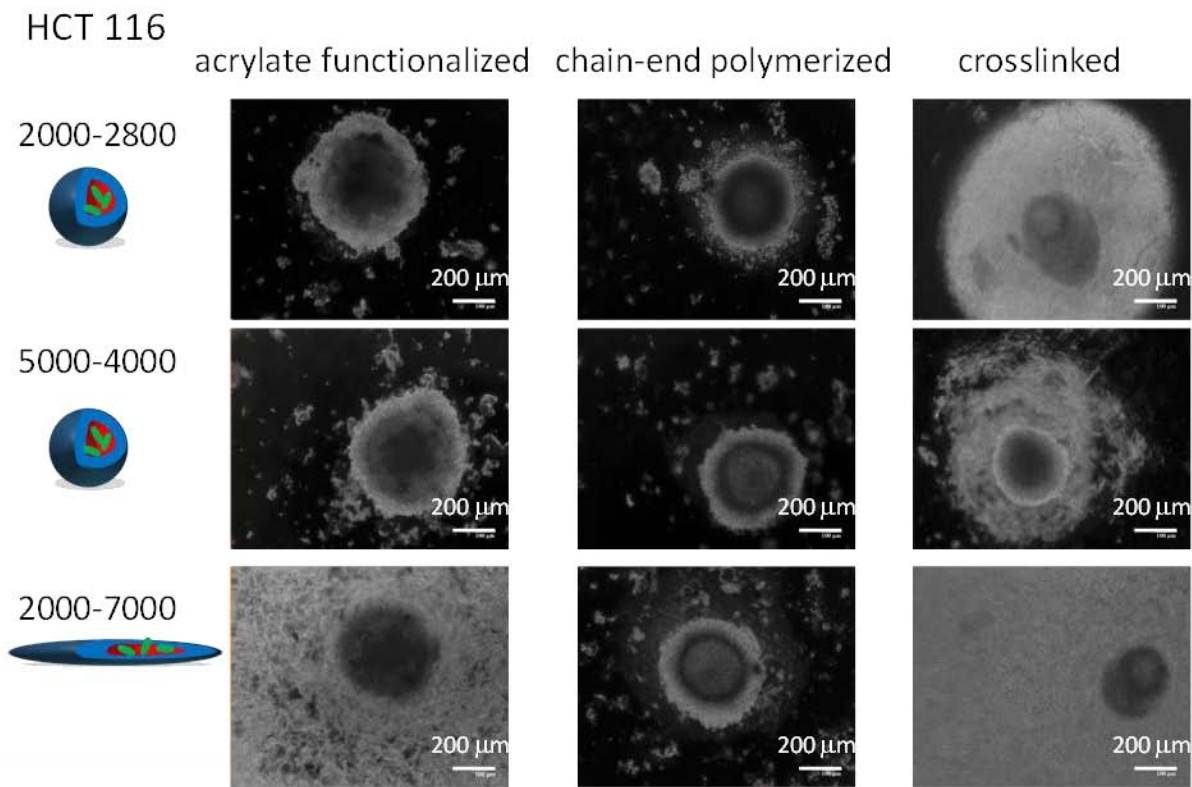
Figure III-12 : photocytotoxicité du Phéo seul et encapsulé dans les différents vecteurs de PEO-PCL 2000-2800 en monocouche 2D de HCT- 116

b. En culture 3D ou sphéroïdes

Afin d'évaluer l'efficacité PDT dans un environnement plus pertinent à la situation *in vivo* par rapport à la culture cellulaire 2D, les tests de cytotoxicité et photo-cytotoxicité des différents systèmes ont été réalisés sur des sphéroïdes de tumeur multicellulaires 3D produites avec les lignées cellulaires

HCT-116 et FaDu (cancer du cou et de la tête). Afin d'appliquer la PDT sur des sphéroïdes de taille similaire, la densité de l'ensemencement des cellules a été adaptée puisque les cellules FaDu prolifèrent plus lentement que HCT-116.

Des clichés de microscopie optique typiques sont présentés dans la Figure III-13 . Il me semble important de préciser que les clichés sont pris en vraie couleur par une caméra à spectre complet et analysés dans ces couleurs sur fond noir du fait de la méthode de prise d'image. La couleur étant générée par le rouge phénol présent dans le milieu. L'évaluation de cellules vivantes par le procédé de microscopie a été validé (La méthode de validation est développé dans les annexes), la Figure III-13 représente ainsi la surface des sphéroïdes en fonction du temps. Sur ces graphiques, la taille initiale au jour 0 a été mesurée avant le processus de photoactivation qui a eu lieu aux jours 0, 1 et 2. Pour chaque expérience, le contrôle consistait en un sphéroïde exposé ni à l'auto-assemblage ni au Phéo mais soumis au protocole de photoactivation similaire aux autres échantillons.



FaDu

acrylate functionalized

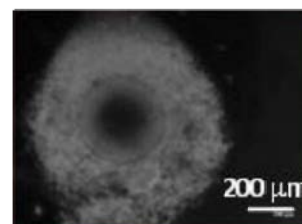
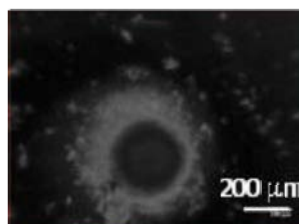
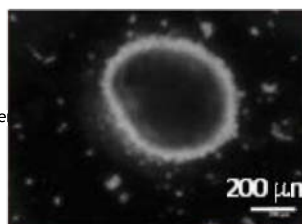
chain-end polymerized

crosslinked

2000-2800



Polyme

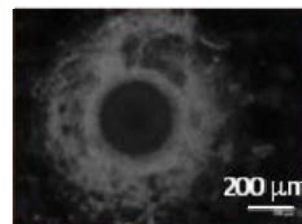
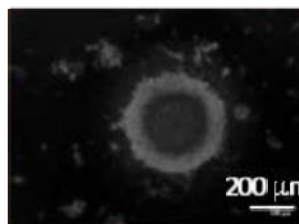
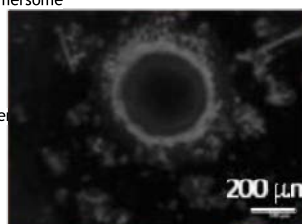


Polymersome

5000-4000



Polyme



Polymersome

2000-7000

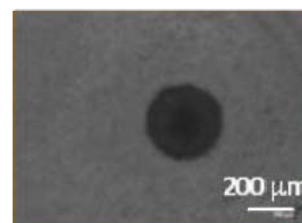
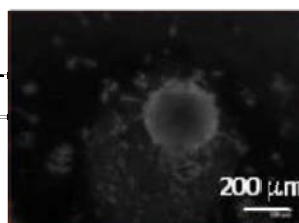
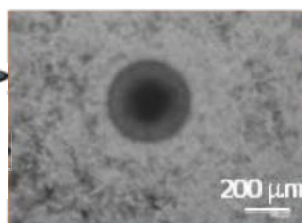


Figure III-13 : Image de différents sphéroïdes traités par les vecteurs à base de PEO-PCL, ici 2000-2800, 5000-4000 et 2000-7000 correspondent respectivement au PEO-PCL 2000-2800, PEO-PCL 5000-4000 et PEO-PCL 2000-7000

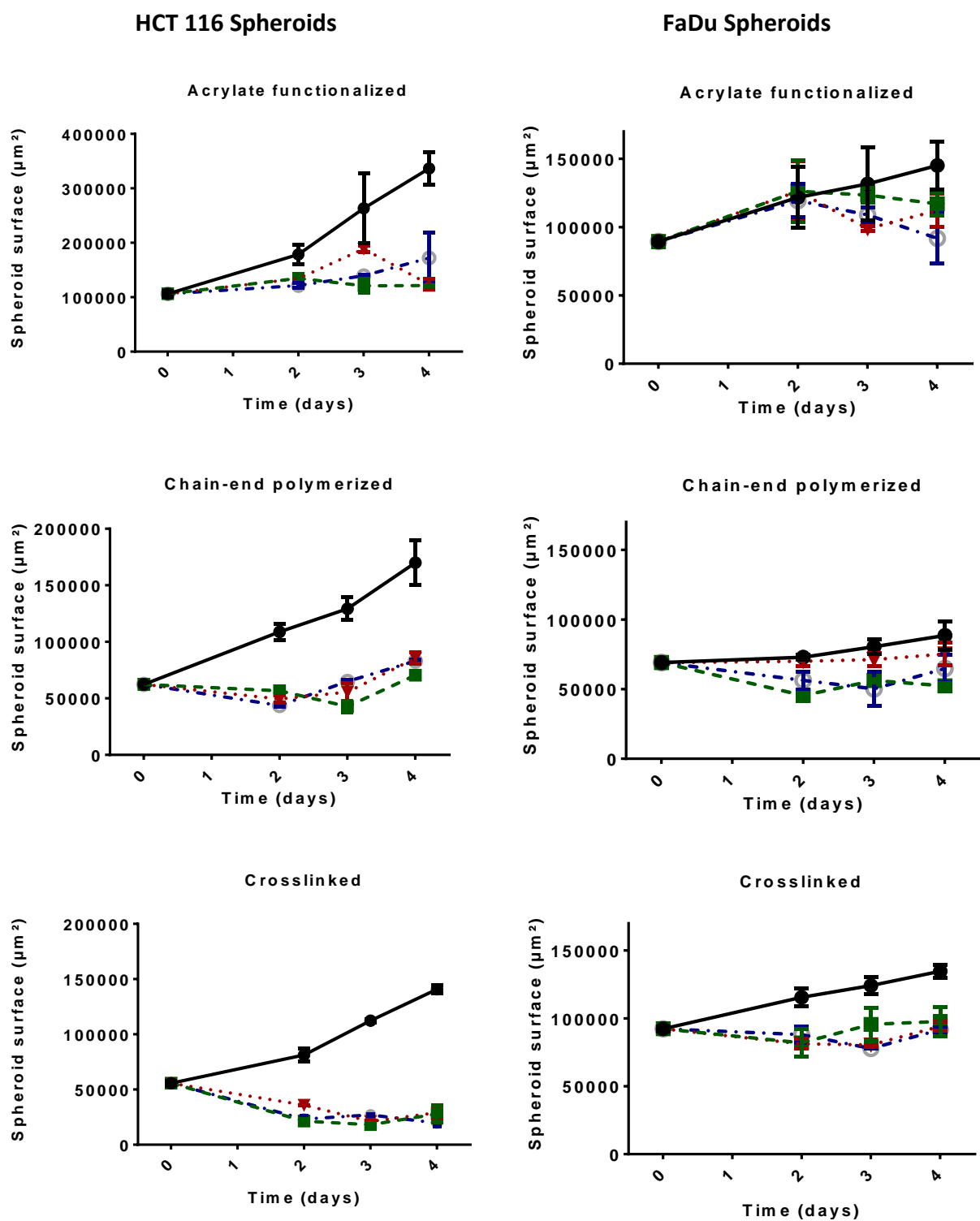


Figure III-14 : Quantification de l'effet PDT par la mesure de la surface des cellules vivantes du sphéroïde sur des cellules FaDu et HCT-116. ● Contrôle sans polymère ni Phéo, ○ PEO-PCL 2000-2800, ▼ PEO-PCL 2000-7000, ■ PEO-PCL 5000-4000

Les expériences de contrôle ont montré que le Phéo seul n'a qu'une faible efficacité PDT en raison de sa tendance à l'agrégation dans l'eau (montré en annexe). Il est inefficace ou presque pour les sphéroïdes FaDu et devient actif sur HCT 116 sphéroïdes à partir du jour 3 et 4, ce qui conduit dans

le meilleur cas à la stabilisation de la taille du sphéroïde et à une diminution de la taille relative de 35% par rapport au témoin.

Son encapsulation cependant conduit à une augmentation de l'efficacité PDT (Figure III-14) pour la micelle fonctionnalisée acrylate et une beaucoup plus forte pour l'objet polymérisé atteignant un maximum d'efficacité pour les systèmes réticulés.

Afin de faciliter la discussion des résultats de la Figure III-14 ont extrait le rapport entre les sphéroïdes traités et le contrôle obtenu au jour 2 et au jour 4. Toutes les micelles d'acrylate fonctionnalisées présentaient une efficacité limitée en PDT dans le cadre des sphéroïdes FaDu au jour 2, mais on observe une amélioration au jour 4 avec une diminution de taille relative de 20% environ par rapport au témoin. Pour les sphéroïdes HCT 116, l'efficacité a été augmentée par rapport au phéo seul, même au jour 2. Quant au jour 4, la diminution de taille relative par rapport au témoin a été de 50%.

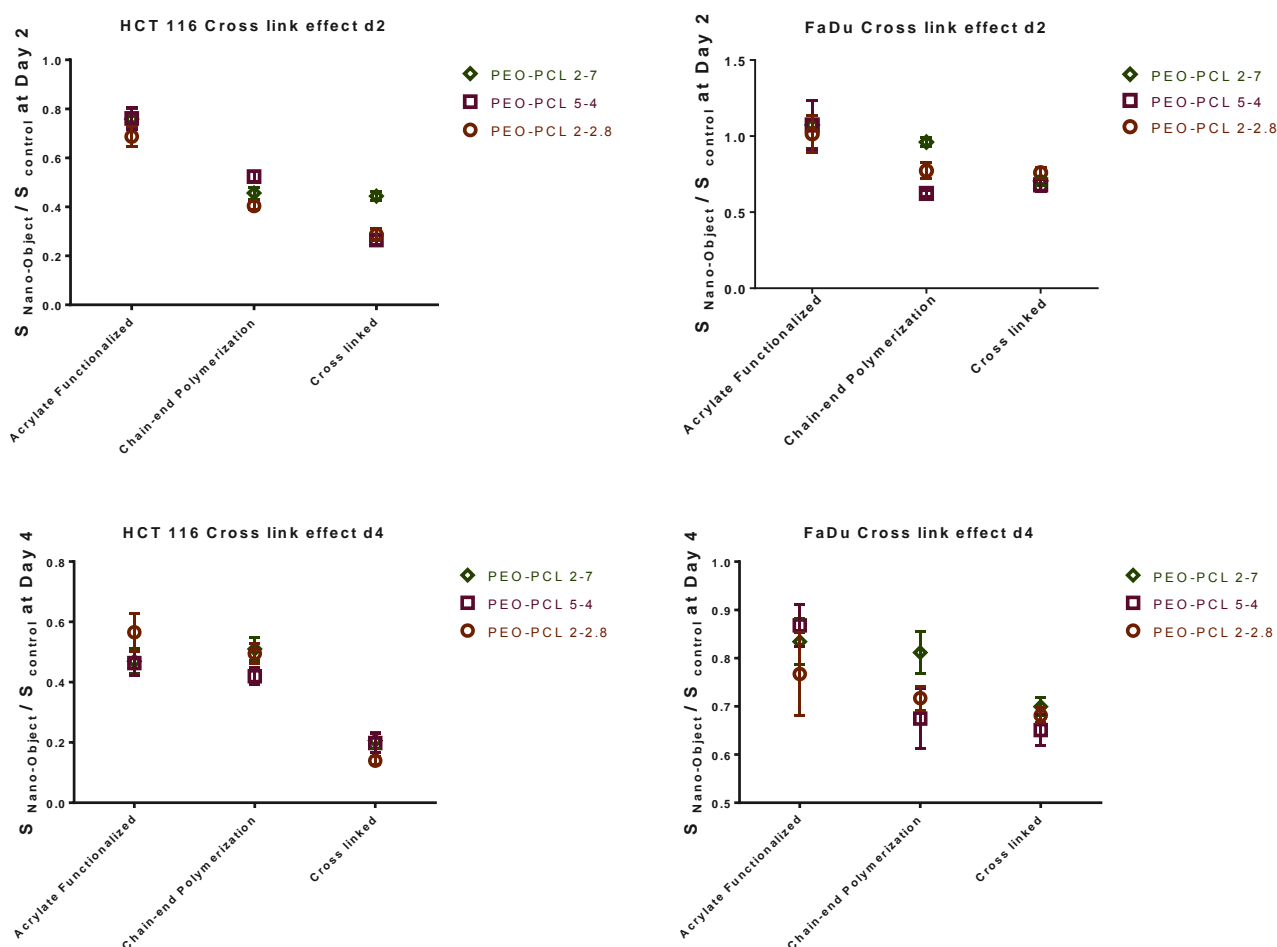


Figure III-15 : Quantification de l'effet PDT par le ratio de la mesure de la surface des cellules vivantes du sphéroïde traité divisé par la surface du sphéroïde control, avec des cellules FaDu et HCT-116. ○ PEO-PCL 2000-2800, ◻ PEO-PCL 2000-7000, ◊ PEO-PCL 2000-7000

Les nano-vecteurs polymérisés (chain-end polymerized) ont été en mesure d'arrêter la croissance du sphéroïde pendant une courte période de temps, ce qui signifie que leur efficacité PDT est supérieure à celle des micelles fonctionnalisées acrylate. Pour les sphéroïdes HCT 116, on observe même une diminution de la taille relative de 60% au jour 2 pour tous les systèmes. Cependant, pour

les sphéroïdes FaDu, il est à noter que les PEO-PCL 2000-7000 polymérisés ont été moins efficaces que les autres polymères. Dans ce cas, les micelles de polymères sphériques sont donc plus efficaces que les auto-assemblages allongés.

Enfin, le plus fort effet de PDT a été observé avec les nano-vecteurs réticulés qui ont amené non seulement une stabilisation de la taille du sphéroïde, mais une diminution marquée de celui-ci, ce qui signifie que les cellules tumorales sont fortement affectées par le traitement. Ceci est clairement visible sur la Figure III-15 autant au jour 2 que 4. Pour les sphéroïdes HCT 116, la diminution relative de la taille est proche de 80% au jour 2 et a approché 90% au jour 4. Là encore, comme pour les PEO-PCL 2000-7000 polymérisés, les objets allongés sont moins efficaces au jour 2. Cependant, leur efficacité est comparable aux autres au jour 4. Enfin, pour les sphéroïdes FaDu, la diminution relative de la taille par rapport au témoin était proche de 40% pour tous les systèmes.

Les résultats de la Figure III-14 montrent dans certains cas des situations intéressantes où le sphéroïde semble bien attaqué. Toutefois, ces expériences ont été arrêtées au jour 4 après seulement 3 irradiations. Une question importante était de savoir s'il était possible d'obtenir une disparition complète du sphéroïde en prolongeant le traitement PDT. Pour examiner ce point, une expérience plus longue a été réalisée. La manipulation est un peu particulière et doit être décrite à nouveau pour en comprendre tous les tenants et les aboutissants.

Comme pour les manipulations précédentes, les sphéroïdes ont étéensemencés 5 jours auparavant et mis en contact avec les objets au jour 0. Mais dans cette nouvelle expérience les illuminations ne s'arrêtent pas au jour 2 mais au jour 4. Les sphéroïdes sont donc aussi illuminés, de la même façon que les jours précédents, au jour 3 et au jour 4.

De plus on sait que les milieux de nos sphéroïdes ne peuvent se maintenir durant 7 jours, les milieux sont donc changés au jour 2 à environ 70% (200µl sur les 300µL totaux des puits moins le volume des sphéroïdes). Certains milieux, nommés Refill dans la Figure III-16 sont remplacés avec du milieu chargé en nano-objets, d'autres sont remplacés en milieu classique, c'est-à-dire sans nano-objets.

Les résultats de cette manipulation sont présentés en Figure III-16.

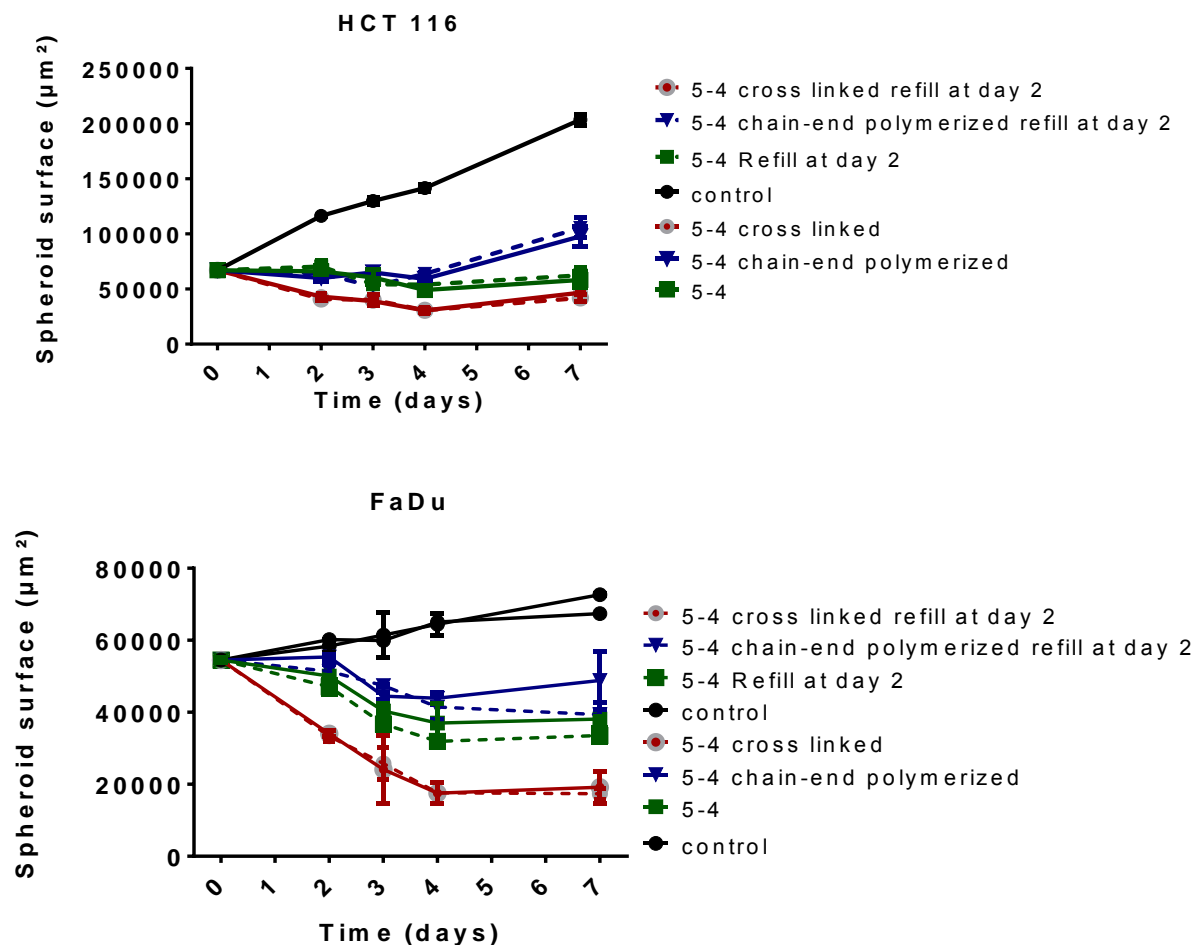


Figure III-16 : Traitement des sphéroïdes sur une semaine

Plusieurs points peuvent être dégagés d'une telle manipulation :

En premier lieu le fait d'avoir laissé deux contrôles dans la plaque FaDu permet d'observer que les sphéroïdes se comportent de la même façon quelle que soit leur position dans la plaque, et que leur seule différence observable se trouve dans l'erreur statistique.

Mais il est important de remarquer qu'il en va de même pour la différence entre les expériences "Refill" (ici en tirets) et simple changement de milieu. Car même si on semble voir une légère dissemblance dans le cas des FaDu, cette variation n'est pas significativement différente. On en déduit donc que la réinjection de Phéo n'est pas nécessaire. Et que, malgré le changement de milieu, une partie des objets est encore présente dans le milieu intra ou intercellulaire, et que cette partie est suffisante pour avoir autant d'effet qu'un ajout classique.

Nous pouvons l'affirmer car l'illumination après le jour 2 bloque la croissance classiquement observée. Il y a donc encore présence de traitement dans le sphéroïde et on observe même une diminution de la surface de celui-ci, encore après le jour 2 quelle que soit la méthode de traitement.

Enfin, il est important de remarquer que l'attaque des sphéroïdes se fait bien par le domaine cellulaire, et non uniquement par une attaque indirecte par la modification du milieu. On a donc nécessairement des Phéo qui ont diffusé à l'intérieur de la tumeur et qui participent à ce traitement.

Ainsi le changement de milieu nous permet d'éliminer l'effet cytostatique d'un milieu détérioré par le médicament.

Cette pénétration a de plus pu être mise en évidence par microscopie à deux photons (Figure III-17). Les clichés montrant la couche à 50µm de la surface montrent pour les sphéroïdes FaDu une pénétration supérieure du Phéo dans le cas du PEO-PCL 5000-4000 allant dans l'ordre réticulé > polymérisé > simple, confortant l'effet PDT observé plus haut. Pour le cas des systèmes allongés PEO-PCL 2000-7000, aucune différence flagrante n'est visible par contre. Un test de comparaison avec les sphéroïdes HCT116 a été effectué sur le système réticulé de PEO-PCL 5000-4000, celui-ci a montré une pénétration facilitée dans le sphéroïde HCT116 comparé au FaDu.

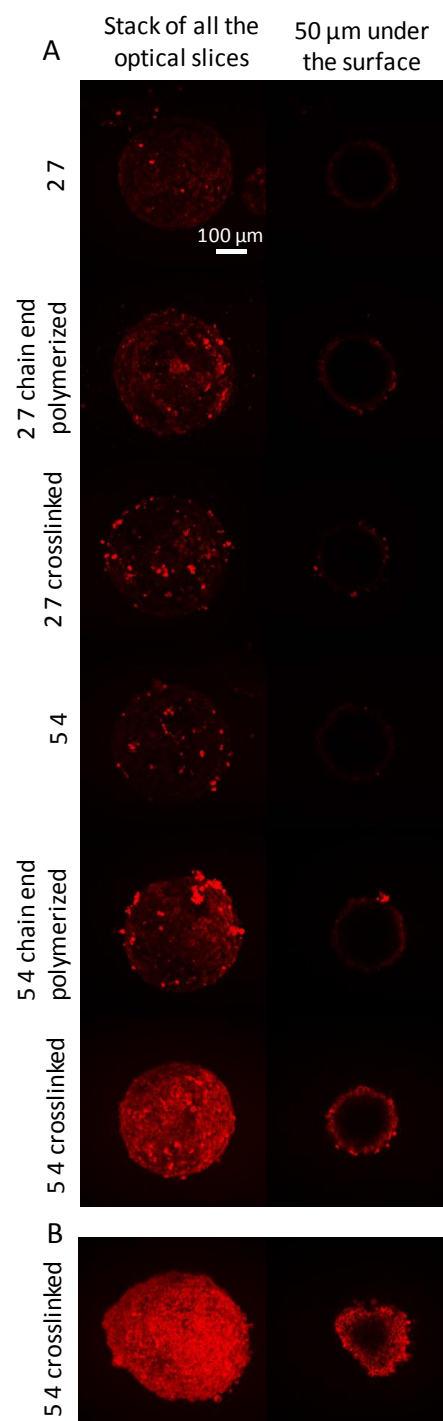


Figure III-17 : Microscopie à deux photons de sphéroïdes au contact de Phéo encapsulé dans différents vecteurs. A : sphéroïdes FaDu. B: sphéroïdes HCT116

A partir de ces résultats, plusieurs points peuvent être extraits.

L'ordre d'efficacité PDT pour tuer les cellules tumorales cultivées en 3D est Phéo seul < Phéo dans les micelles simples < Phéo dans les systèmes polymérisés en bout de chaîne < Phéo dans les systèmes réticulés. Ceci est contraire au comportement observé sur culture cellulaire 2D (Figure III-12), où tous les systèmes (sauf Phéo seul) ont conduit à une mort complète pour des concentrations

comparables. Le comportement observé pour les faibles concentrations en Phéo tend à montrer l'ordre inverse pour les nano-vecteurs.

Cet écart entre 2D et 3D est conforme à la tendance observée dans la littérature pour les études comparant *in vitro* et *in vivo* pour des micelles polymères réticulées. En effet, l'ordre de l'efficacité entre les systèmes non réticulés ou des micelles réticulées est, selon la littérature, différent selon que l'on regarde *in vivo* ou *in vitro*. Par exemple, Hennink et alii ont montré que les micelles réticulées étaient moins efficaces que les classiques pour la Doxorubicine [85] *in vitro*, mais l'inverse a été observé pour les essais *in vivo*. En comparaison, les micelles réticulées sont trouvées comme le système le plus efficace par rapport à celles non réticulées pour des expériences *in vivo* [275].

Fait intéressant, la même tendance de supériorité des vecteurs réticulés a été observée dans l'étude récente de Stenzel [275] à l'aide de sphéroïdes multicellulaires pancréatiques (ASPC-1). Ceci montre que ce comportement est applicable à différentes lignées cellulaires et pourrait avoir une portée générale. Stenzel et alii explique ce comportement par le fait que le médicament encapsulé dans des nanovecteurs réticulés est davantage protégé de l'environnement et moins enclin à diffuser trop rapidement du vecteur. Ils ont montré que la diffusion du médicament encapsulé dans le sphéroïde est un processus transcellulaire dans leur cas. Ils suggèrent qu'une libération anticipée du médicament par les micelles non réticulées, ou dans le cas du médicament non encapsulé, conduit à une formation de couches externes de cellules en apoptose, ce qui ralentit ou arrête la progression du reste de médicament dans le sphéroïde pour attaquer les couches internes. Le système réticulé, en ralentissant la libération, pourrait donc être sur la bonne échelle de temps pour diffuser avant de relâcher et de tuer les cellules. En comparaison, dans les cultures cellulaires 2D, la réticulation pourrait agir comme un ralentissement de la libération par rapport aux systèmes libres ou non réticulés.

L'existence de divergences entre 2D et 3D des cultures de cellules n'est pas très surprenante et a déjà été rapportée dans la littérature. Sur la base de nos résultats, le modèle sphéroïde 3D devrait être un modèle plus fiable, montrant des effets différents qui doivent être pris en compte pour l'application finale réelle. Afin d'éradiquer les tumeurs solides, la pénétration du médicament le plus profondément possible est essentiel. Clairement les expériences de culture cellulaire 2D ne peuvent pas fournir une réponse fiable sur ce point.

5. Conclusion

Comme mentionné dans l'introduction, le but de notre travail était double: d'abord de comparer l'efficacité de nano-objets réticulés dans le domaine de la thérapie photodynamique (PDT), puis de comparer les résultats entre les cultures cellulaires 2D et 3D.

Concernant le point de vue PDT de notre travail, la capacité supérieure démontrée par les nanovecteurs réticulés à apporter efficacement le Phéo à l'intérieur des sphéroïdes est illustrée sur les deux lignées cellulaires (nominativement FaDu et HCT 116) et autant par des micelles polymères que par des assemblages allongés. Cela corrobore les résultats très récemment obtenus par Stenzel et alii. De toute évidence, ces objets doivent donc être considérés comme ayant un potentiel élevé pour l'administration de médicaments dans des applications cliniques.

Nous avons choisi les trois polymères différents pour caractériser l'influence de la masse molaire du polymère pour les vecteurs ayant la même taille et la forme de type sphérique / allongée. En comparant PEO-PCL 2000-2800 à PEO-PCL 5000-4000, on montre que les deux systèmes ont une

activité PDT similaire. La masse molaire du polymère ne donne pas lieu à un changement de l'efficacité, du moment que le nano-vecteur conserve une taille et des caractéristiques de surface similaires.

Quant à l'effet de forme, l'auto-assemblage de PEO-PCL 2000-7000 ne démontre pas dans notre cas une plus grande efficacité que les micelles sphériques. Cependant cette différence est souvent prise en compte dans des modèles de flux et dans des modèles comportant des macrophages pour lesquels la capacité d'évitement est essentielle. Or dans notre cas les lignées utilisées sont pures et le sérum a précédemment été décomplémenté pour éviter tout problème d'interaction avec les cellules.

En ce qui concerne la culture de cellules en 3D, les résultats distincts et différents du modèle 2D et du modèle 3D montrent le grand soin qui devrait être pris pour étudier l'efficacité d'un traitement avec des nanovecteurs. Les résultats obtenus en 2D ne correspondent pas nécessairement à ceux observés directement en 3D ou dans des conditions *in vivo* et peuvent parfois être le contraire comme le cas montré de la réticulation.

Si la 3D semble donc une grande amélioration pour les tests, la question reste ouverte de savoir si elle constitue un bon modèle pour les expériences *in vivo*, le but des sphéroïdes étant la possibilité de limiter le nombre d'animaux sacrifiés. Ceci est actuellement l'objet d'une certaine pression de l'opinion publique, comme le montre la très récente initiative citoyenne européenne "Stop Vivisection", pour laquelle l'Union européenne vient de répondre [279].

Chapitre 4 : Mélanges

IV. Mélanges

1. Introduction

Les différents auto-assemblages testés dans le chapitre 3 ont révélé un cas qui a retenu notre attention, celui du PEO-PCL 2000-4800. En effet, celui-ci a conduit à un mélange de morphologies micellaires et vésiculaires. Son efficacité en PDT a été toute aussi bonne que celle des systèmes unimorphes indiquant que la pureté morphologique des auto-assemblages n’est pas une condition indispensable pour l’application visée. Cette idée, bien que concevable, est plutôt contraire à la démarche usuellement suivie de développer des vecteurs les plus purs possibles. C’est pourquoi nous avons décidé d’examiner cette question de façon systématique en créant artificiellement des mélanges de vecteurs polymères bien définis puis d’analyser leur efficacité en PDT de la même façon que précédemment.

Trois types de polymères ont été choisis pour la fabrication des auto-assemblages (Figure IV-1 et Tableau IV-1): poly(oxyde d'éthylène-b-ε-caprolactone) (PEO-PCL), le poly (oxyde d'éthylène-b-styrène) (PEO-PS) et de poly (oxyde d'éthylène-b-méthacrylate de méthyle) (PEO-PMMA).

Par conséquent, dans cette étude, la plupart des expériences ont utilisé ce polymère avec différentes masses molaires (PEO-PCL 5 000-11 000, PEO-PCL 5 000-4 000, PEO-PCL 2000-7000, PEO-PCL 2000-4800) ce qui nous a permis d'obtenir différentes morphologies. PEO-PS et PEO-PMMA ont été seulement utilisés dans des tests secondaires pour étudier le caractère général de certains points tel que les effets de taille sur la DLS ou un possible effet lié à la structure de la partie hydrophobe.

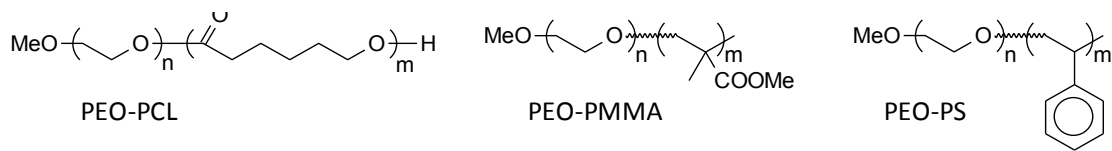


Figure IV-1 : Polymères utilisés dans ce chapitre

Polymère	Mn du bloc PEO (g.mol ⁻¹)	Mn du bloc hydrophobe (g.mol ⁻¹)	f _{hydrophile} (wt %)	Methode de préparation
PEOPCL 2000-4800	2000	4800	29.4	Réhydratation de film
PEOPCL 2000-7000	2000	7000	22.2	Réhydratation de film
PEOPCL 5000-11000	5000	11000	31.2	Réhydratation de film
PEOPCL 5000-4000	5000	4000	55.5	Cosolvant Acétone
PEO-PS 3100-2300	3100	2300	57.4	Cosolvant Acétone
PEOPMMA 5000-11900	5000	11900	29.6	Cosolvant Acétone

Tableau IV-1 : Formation des nano-objets et fraction hydrophile

Les nano-objets polymères ont été formés suivant les procédures déjà décrites, en utilisant soit une approche de cosolvant où une solution polymère organique est ajoutée dans de l'eau pure, ou une réhydratation de film suivie par des procédés sonication/extrusion. Ils ont été caractérisés par TEM et DLS dans les chapitres précédents et résumés ici (Tableau IV-2). Les morphologies associées pour chaque polymère sont également signalées, montrant la nature : qu'elle soit micellaire, vésiculaire ou auto-assemblages allongés ou worm-like.

Polymère	D _H (nm) moyenne en intensité	D _H (nm) moyenne en nombre	PDI	Morphologie
PEOPCL 5000-11000	166	88	0.16	vésicules
PEOPCL 5000-4000	25	15	0.30	micelles
PEOPMMA 5000-11900	35	20	0.20	micelles
PEOPCL 2000-7000	198	82	0.24	worm-like
PEO-PS 3100-2300	20	15	0.30	micelles

Tableau IV-2 : Caractérisation DLS des systèmes

Il a donc été nécessaire de se pencher sur les mélanges de nano-objets, autant pour les limites de détection des méthodes classiques, rapidement abordées précédemment, que pour les effets biologiques possibles grâce à une telle interaction de différents objets.

2. Analyse DLS

Des mélanges de différentes morphologies ont donc été ensuite formés à partir de ces solutions par simple mélange dans des rapports différents. Un premier cas a consisté en un mélange de PEO-PCL 5 000-4 000 / PEO-PCL 5 000-11 000, associant des micelles de 15 nm à des vésicules de 88 nm, qui a été caractérisé par DLS et par AsFIFFF. L'analyse DLS est présentée dans la Figure IV-2 pour des rapports en masse de PEO-PCL 5 000-11 000 entre 0 et 20%. Ces résultats ont été obtenus à partir de données Malvern retraitées par un logiciel appelé STORMS développé au laboratoire par C. Mingotaud. Celui-ci a été créé dans le but de pouvoir analyser de façon plus rigoureuse les données DLS obtenues sur l'appareil Malvern. A partir du corrélogramme, toutes les étapes menant à la détermination de la taille de l'objet diffusant sont menées en permettant à l'utilisateur de choisir un certain nombre de paramètres et de méthodes de corrélation. Dans notre cas, les corrélogrammes ont été analysés par la méthode NNLS en supposant une géométrie sphérique et une morphologie de mélange de micelles et vésicules. La fiabilité de la mesure est ensuite jugée selon l'analyse des résiduels qui doivent être inférieurs à $5 \cdot 10^{-3}$ sur l'ensemble du corrélogramme. Le logiciel est détaillé en annexe et dans l'article [149].

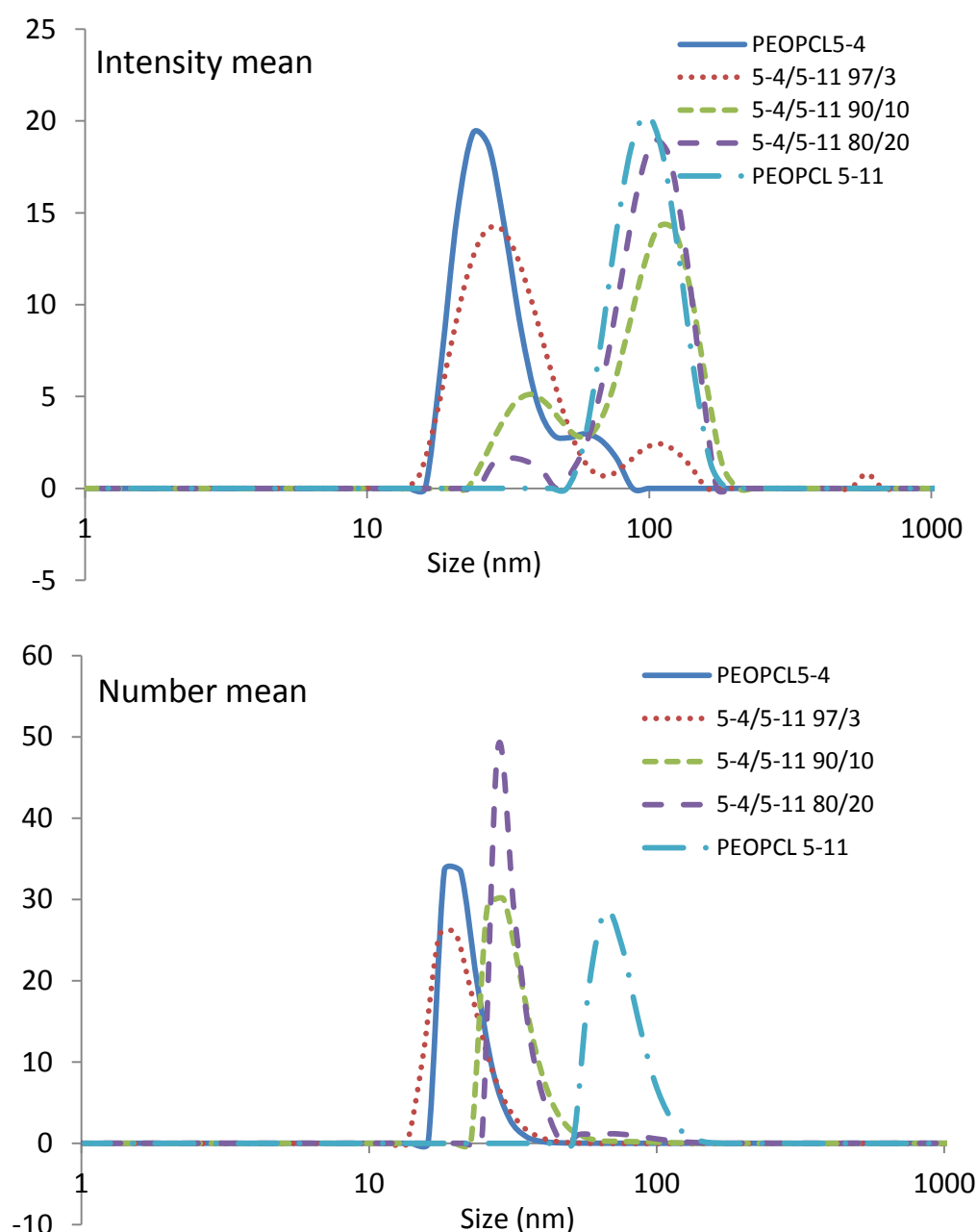


Figure IV-2 : Analyse STORMS DLS du PEO-PCL 5 000-4 000 mélangé au PEO-PCL 5 000-11 000 en intensité (figure du haut), et en nombre (figure du bas). Les pourcentages indiqués sont en ratio massique.

Dans ces conditions, la population micellaire de PEO-PCL 5 000-4 000 devient quasi-invisible dès que la teneur en PEO-PCL 5 000-11 000 est supérieure à 20% en masse. Ce n'est pas une surprise en soi, puisque l'intensité diffusée d'un objet est liée à sa taille à la puissance 6, mais cette expérience est une démonstration sans équivoque de cet inconvénient de la DLS.

De plus, dans le cas de l'analyse en nombre, on observe ceci de façon encore plus importante car seul l'échantillon 80/20 laisse entrevoir une seconde population très loin des pourcentages réels d'objet si l'on intègre les pics.

Un deuxième mélange d'auto-assemblages a été étudié associant cette fois des micelles de 20nm de PEO-PMMA 5000-11900 à des vésicules de PEO-PCL 5000-11000 de 270 nm. On remarque que dans ce cas les vésicules PEO-PCL 5 000-11 000 sont nettement plus grandes que les précédentes ; Ce travail n'ayant été fait que dans l'optique d'une analyse DLS et non reporté ensuite en biologie ou en AsFIFFF cet artéfact (taille différente), qui arrive parfois si la création des objets n'est pas parfaite (bain à ultrason déficient, film trop épais, séchage trop court), ne pose pas de réel souci.

Les analyses DLS retraités par STORMS sont présentées Figure IV-3.

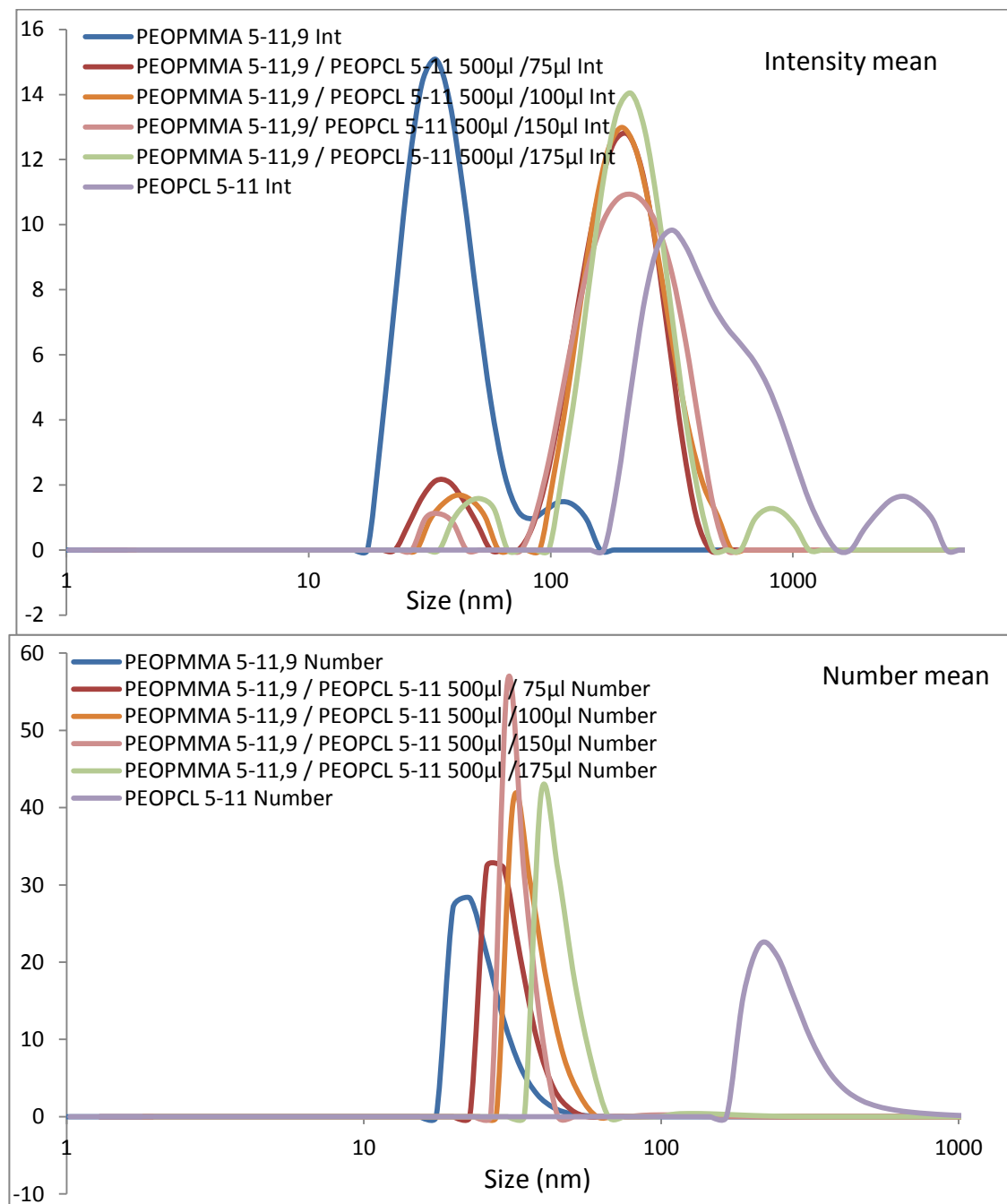


Figure IV-3 : Analyse STORMS DLS du mélange de PEO-PMMA 5000-11900 avec du PEO-PCL 5 000-11 000 en intensité (figure du haut), et en nombre (figure du bas)

Ici, l'écart de taille entre les deux populations d'auto-assemblages est plus grand. On observe le même genre de comportement que pour le premier cas : en intensité, le pic des micelles devient minoritaire très rapidement, dès 13 % de vésicules présentes, et en nombre, le programme propose une taille qui augmente progressivement. La modification de la nature des polymères ne change pas, comme prévu, les résultats. Ceci caractérise donc un des plus gros défauts, bien que connu, de la DLS en batch. Cependant, bien que ce défaut soit lié à la méthode même de détection n'est-il pas possible de le réduire grâce à un traitement des données plus approfondi ?

Afin de répondre à cette question, nous avons fait varier plus systématiquement les paramètres d'analyse proposés dans le logiciel STORMS (dont le fonctionnement est détaillé en annexe).

Ce travail a été réalisé sur le mélange de micelles PEO-PCL 5000-4000 et vésicules PEO-PCL 5000-11000 à un ratio de 80/20. L'idée était de voir si le logiciel pouvait, aussi bien dans l'analyse en intensité que celle en nombre, retrouver la présence des deux populations. Pour cela, plusieurs paramètres ont été systématiquement modifiés dans le programme Storms : le paramètre de régularisation (alpha), le domaine de répartition (range), le paramètre d'expansion (conduisant à l'utilisation privilégiée des premiers points du corrélogramme) et le paramètre de pondération (chaque point du corrélogramme étant adressé à un poids égal ou différent en fonction de sa valeur variant ici entre 1 et g).

Alpha	Range	Expansion	Weighting*	PEO-PCL 5 000-4 000 Int	PEO-PCL 5 000-11 000 Int	Mélange 80/20 Int	PEO-PCL 5 000-4 000 Nombre	PEO-PCL 5 000-11 000 Nombre	Mélange 80/20 Nombre
10	2	1	g	30	100	102	20	68	62
10	2	1	1	28	100	104	20	74	26
10	2	0	g	30	100	102	20	68	64
5	2	1	g	28	100	104	22	70	22
10	1	1	g	28	100	104/28	22	80	28
5	2	0	1	28	100	104	22	88	32
10	2	0	1	22	100	104	22	74	26
20	2	0	g	30	102	102	20	66	60
8	2	0	g	28	100	102	20	70	64
8	2	1	g	30	100	102	20	68	62

Tableau IV-3 : Analyse DLS du mélange 80/20 %massique de PEO-PCL 5 000-4 000 PEO-PCL 5 000-11 000

**1 indique que tous les points ont le même poids dans le calcul, g que les poids sont liés à leur valeur*

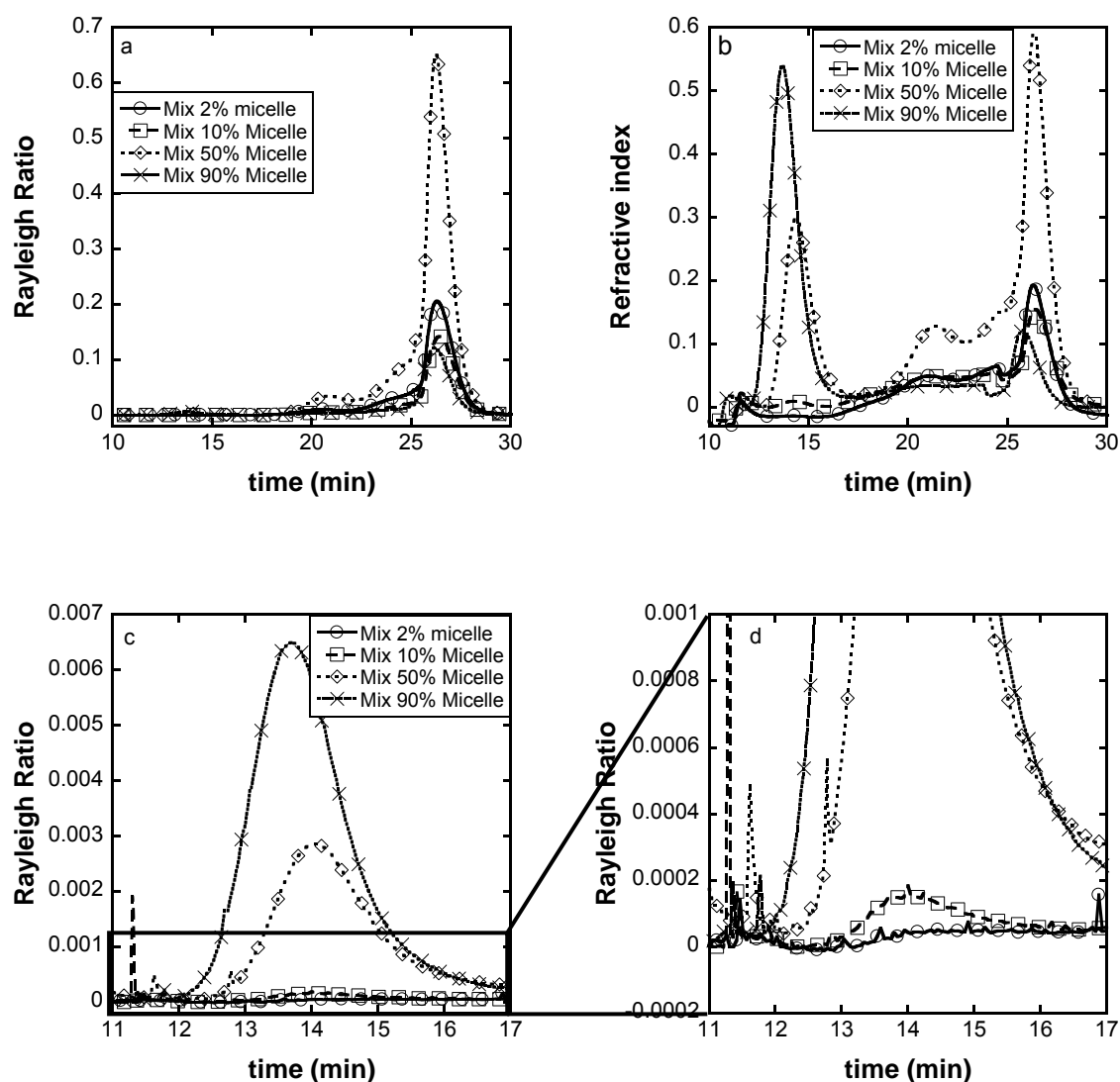
Les résultats sont présentés dans le Tableau IV-3. L'analyse des auto-assemblages purs a aussi été réalisée pour pouvoir les comparer avec les résultats obtenus en mélange. Sur ceux-ci, avec les paramètres variables, tous les résultats en intensité sont stables, les micelles étant trouvées entre 22 et 30 nm, alors que les vésicules se trouvent entre 100 et 102 nm. Pour les analyses relatives en nombre des populations, les résultats obtenus pour les micelles ou vésicules pures sont également raisonnablement stables quels que soient les paramètres, avec une valeur moyenne de 21 ± 1 pour les micelles et 73 ± 7 pour les vésicules.

Pour le mélange 80/20, les résultats en intensité ne montrent que dans un seul cas la présence des micelles. Pour l'analyse en nombre, la situation est plus compliquée avec un résultat hésitant clairement entre 22-32 et 60-64 nm. Ceci montre que, même dans cette solution de composition connue, le traitement de la DLS ne peut que donner des résultats incertains. Il serait donc absurde

d'attendre de l'analyse DLS des résultats sans ambiguïté pour des solutions inconnues présentant plusieurs populations. Dans un tel système, la présence d'une population unique dans la DLS ne peut être considérée comme une preuve de la pureté des nano-objets.

3. Analyse par AsFIFFF

Le mélange type PEO-PCL 5 000-4 000 / PEO-PCL 5 000-11 000 a ensuite été analysé par AsFIFFF, et les fractogrammes sont présentés dans la Figure IV-4. Cette technique a permis de séparer les deux populations avant leur détection. Ainsi, dans ce cas, le rapport entre les micelles et vésicules peut être observé directement à partir du signal réfractométrique tant que les deux auto-assemblages présentent le même incrément d'indice de réfraction, ou avec un calcul dans le cas contraire.



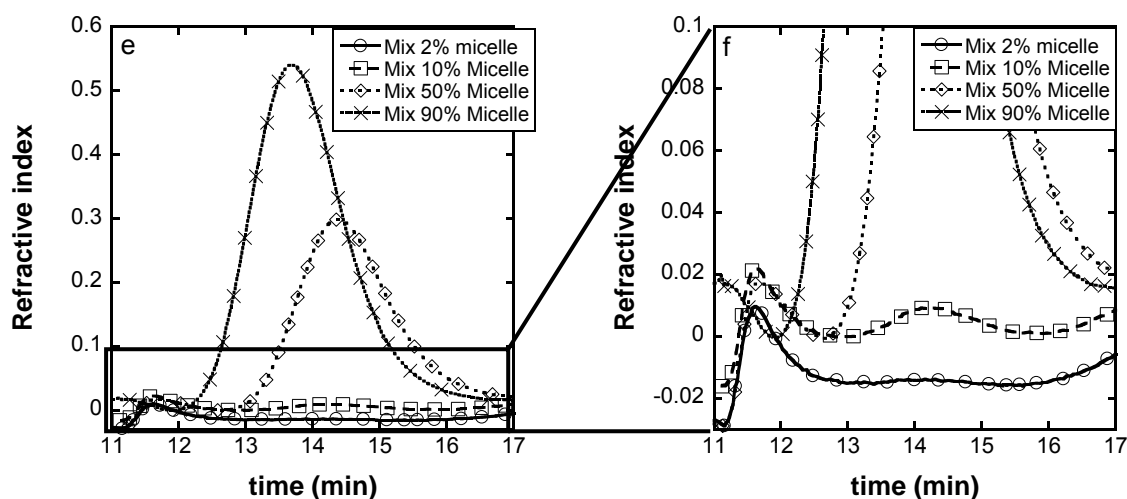


Figure IV-4 : Fractogrammes AsFIFFF du mélange PEO-PCL 5 000-4 000/ PEO-PCL 5 000-11 000. a) Signal MALS, b) Signal RI, c) et d) signal MALS zoomé sur la zone des micelles, f) et e) signal RI zoomé sur la zone des micelles.

On observe bien sur ces fractogrammes entre 12 et 16 minutes la partie micellaire des mélanges que ce soit en signal RI ou MALS, même si pour le signal MALS le zoom est nécessaire.

Le premier épaulement observé entre 20 et 25min dans la zone des polymersomes n'est quant à lui pas représentatif d'une population à part entière de polymersomes mais est lié à la méthode et à la manipulation du flux qui est nécessaire pour voir apparaître sur un même fractogramme et côte à côte ces deux objets si différents. Il aurait pu être ôté grâce à une plus longue mise au point mais le but d'analyse ayant été atteint nous avons décidé de ne pas pousser plus loin.

Par cette analyse d'AsFIFFF, les quantités de micelles aussi faibles que 10% en masse sont encore observables sans aucun doute. Ceci doit être comparé au rapport de 80% en masse pour les analyses batch DLS pour révéler la puissance de l'AsFIFFF, ce qui permet, en une analyse unique de fractionnement de séparer et analyser des nano-objets très dissemblables.

En outre, l'AsFIFFF est aussi une technique efficace pour évaluer le taux de molécules encapsulées au fil du temps. Nous l'avons ainsi utilisée pour quantifier le rapport des Phéo échangés entre micelles de différentes structures chimiques et polymersomes. Pour cela, différentes micelles polymères chargées en Phéo à hauteur de 1/30 mol/mol ont été mises en contact à $t = 0$ avec une solution de polymersomes PEO-PCL 5 000-11 000 vides. Le signal du Phéo présent dans ces polymersomes a ensuite été suivi avec le temps par l'analyse des fractogrammes AsFIFFF (Figure IV-5). Afin de mettre en évidence un effet de la nature chimique du bloc hydrophobe, des micelles de poly (oxyde d'éthylène-b-styrène) (PEO-PS) et de poly (oxyde d'éthylène-b-méthacrylate de méthyle) (PEO-PMMA) ont été aussi utilisées en comparaison des micelles PEO-PCL.

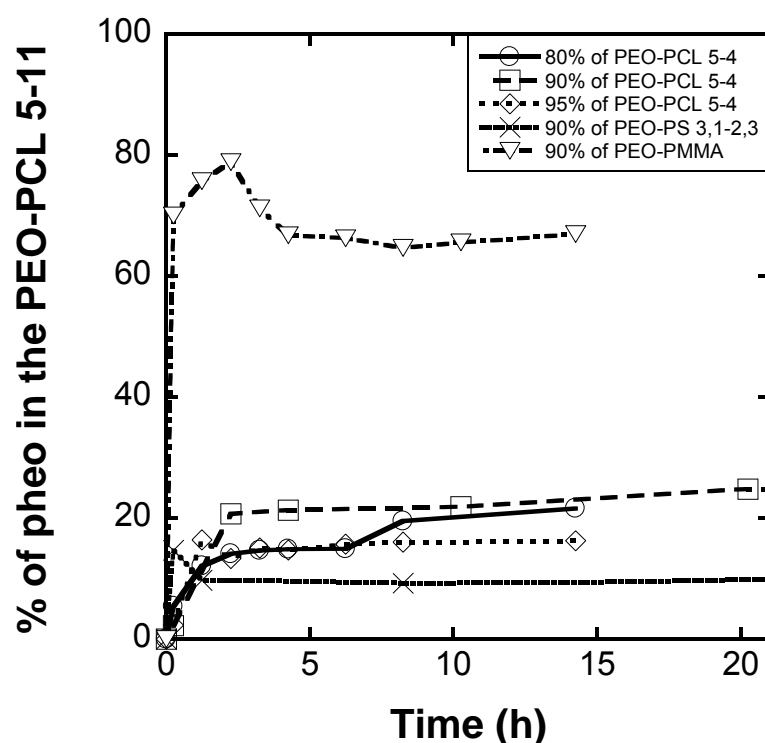


Figure IV-5 : Pourcentage de Phéophorbide dans le PEO-PCL 5 000-11 000 après un temps de mise en contact avec une autre micelle chargée en Phéo.

Il convient d'analyser les résultats et leur intérêt dans la situation de mélange. Ainsi lorsqu'on observe les différents nano-objets classiquement il est impossible de savoir dans quelle population est répartie la charge de molécule active, alors que l'AsFFFF le permet sans difficulté particulière. L'expérience est d'autant plus aisée à analyser que les différents objets micellaires sont de taille comparable entre 10 et 20nm (nous n'avons donc pas d'effet de taille à prendre en compte).

On observe que, dans le cas présent, le polymère interne a un rôle très important défini par son affinité avec la molécule transportée. Les micelles PEO-PS gardent ainsi presque tout le phéophorbide, et, au contraire, les micelles PEO-PMMA échangent rapidement le Phéo avec les polymersomes possédant à première vue une bien plus grande affinité et ce même si ils ne sont qu'à 10% massique dans le milieu.

Mais quel que soit l'objet, l'échange et l'atteinte du palier est très rapide et se fait entre 20 minutes et 1h.

Enfin on observe que le pourcentage des différentes familles (variant entre 80 et 95% massique de micelle dans le milieu pour les PEO-PCL 5 000-4 000) semble avoir peu d'influence sur la répartition finale en phéophorbide et reste assez proche du domaine de l'erreur, l'expérience n'ayant été menée qu'une seule fois.

On mesure donc ici l'impact du bloc hydrophobe seul et ceci quelle que soit la concentration des différents objets. Ce dernier semble être le facteur clé de l'échange modélisé ici. Cette simple expérience est aussi à rapprocher des phénomènes envisageables lors de l'application réelle. Le Phéo

est sujet à changer de transporteur dès la mise en contact avec le milieu biologique. Ce point a d'ailleurs été le sujet d'une étude plus approfondie de notre équipe en utilisant le processus de FRET entre deux sondes fluorescentes [274].

On a donc grâce à L'AsFIFFF un outil qui nous permet aussi bien de différencier les familles d'objets avec une grande précision que de les caractériser de façon critique. Il permet de plus de connaître leur charge qui n'est pas dispersée par les conditions douces d'analyse et de savoir quelle population de vecteur est chargé et à quel point.

4. Analyses biologiques et efficacité PDT

Après avoir caractérisé les mélanges obtenus, et afin d'évaluer leur efficacité en PDT, des sphéroïdes de cancer du côlon (HCT 116) ou de la tête et du cou (FaDu) ont été formés, incubés avec les nano-objets Phéo chargés et irradiés pour induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène conduisant à la mort des cellules, en suivant les procédures déjà présentées et publiées et détaillé en annexe [274].

Les résultats montrant la taille des sphéroïdes selon les conditions sont présentés dans la Figure IV-6 pour les nano-objets purs et la Figure IV-7 pour les mélanges

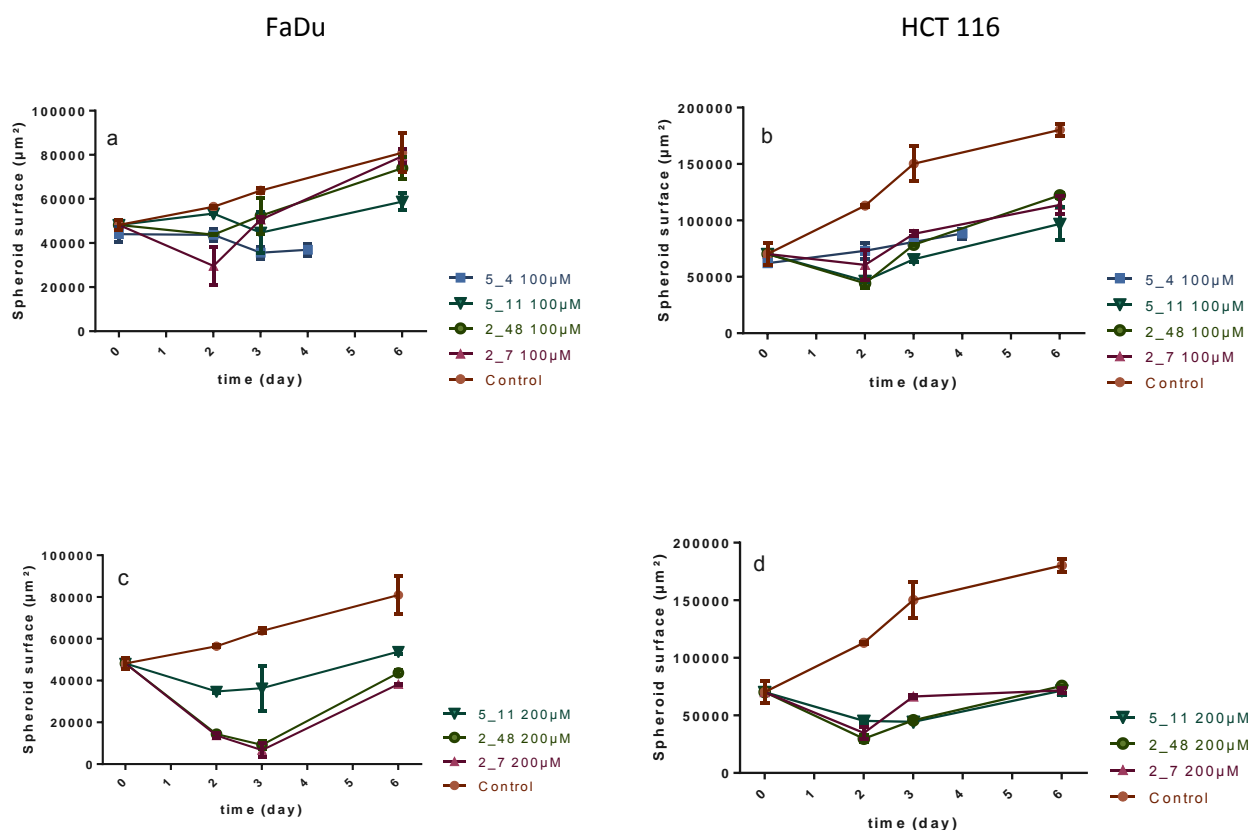


Figure IV-6 : Evolution de taille des sphéroïdes après application de la PDT, à gauche les FaDu, à droite les HCT 116, a et b : [Phéo] = 3.33 μM ; c et d : [Phéo] = 6.67 μM.

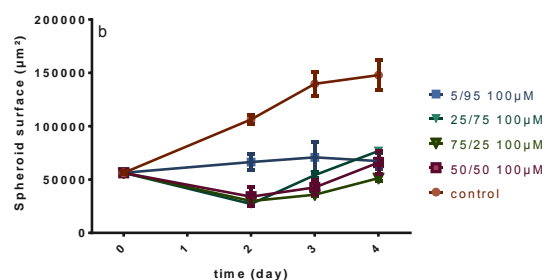
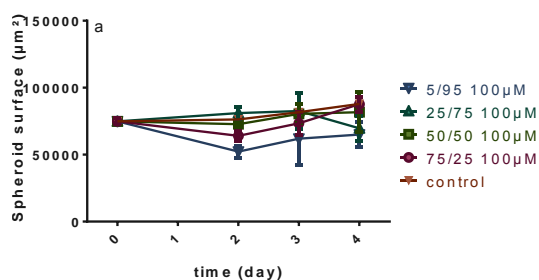
Comme on s'y attendait, l'augmentation de la concentration en agent photosensibilisant conduit à une meilleure efficacité de la PDT, l'utilisation d'une concentration en Phéo de 3,33 μM fournissant un arrêt de la croissance sphéroïde alors qu'une concentration à 6,67 μM a donné au moins une diminution temporaire de la taille.

Sur la base de ces résultats préliminaires, nous avons décidé d'utiliser la plus faible concentration de Phéo de 3,33 μM pour les expériences ultérieures sur les mélanges. Ce choix a été fait dans l'optique de pouvoir différencier les effets gardant ainsi autant une marge de progression et une possibilité d'avoir un effet supérieur facilement discernable et statistiquement différent.

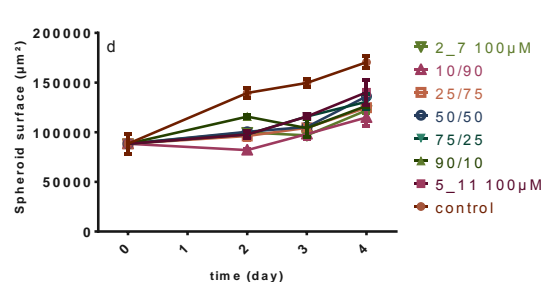
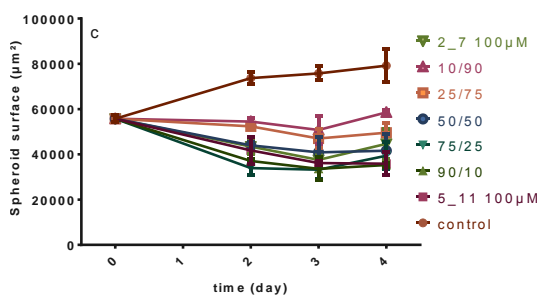
FaDu

HCT 116

5_11/5_4



5_11/2_7



2_7/5_4

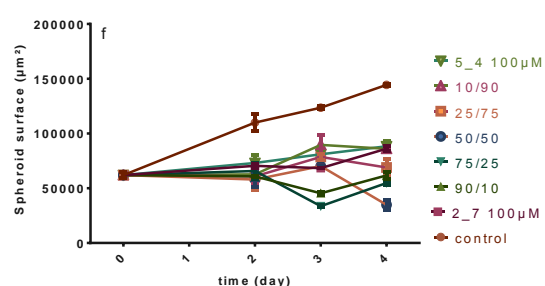
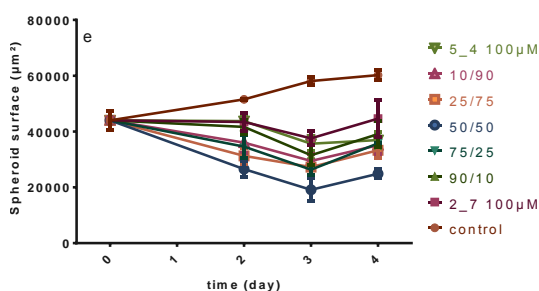


Figure IV-7 : Taille des sphéroïdes après application d'un traitement PDT. A gauche pour la lignée FaDu (a,c,e), à droite pour la lignée HCT 116 (b,d,f). Mélange de PEO-PCL 5 000-11 000/ PEO-PCL-5 000-4 000 pour la première ligne (a,b). PEO-PCL 5 000-11 000/PEO-PCL 2 000-7 000 pour la seconde (c,d), et PEO-PCL 2 000-7 000/PEO-PCL 5 000-4 000 pour la dernière. Les ratios sont présentés en fraction massique.

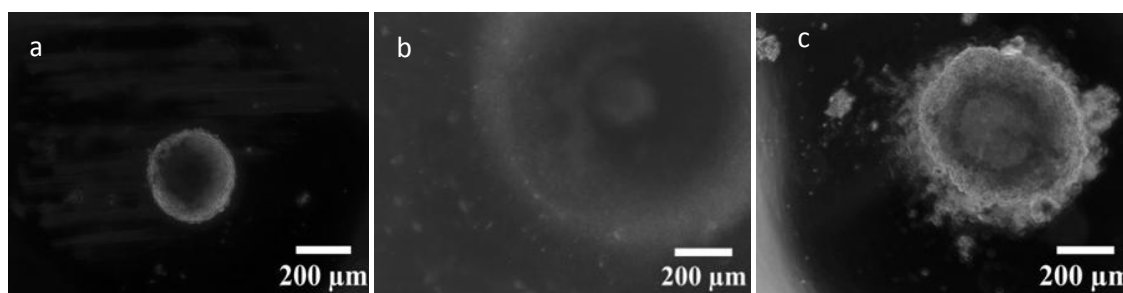


Figure IV-8 : Image typique des sphéroïdes traité vue par microscope à champs large.
a : Sphéroïde contrôle, b : Sphéroïde FaDu traité (PEO-PCL2000-7000 / PEO-PCL 5000-11000), c : Sphéroïde HCT 116 traité (PEO-PCL 5000-11000 / PEO-PCL 5000-4000)

La plupart de ces courbes montrent une nette différence entre le contrôle (sphéroïde sans polymère ni Phéo) et les nano-objets avec le Phéo encapsulé, conduisant à une diminution de la taille de sphéroïde ou au moins sa stabilisation.

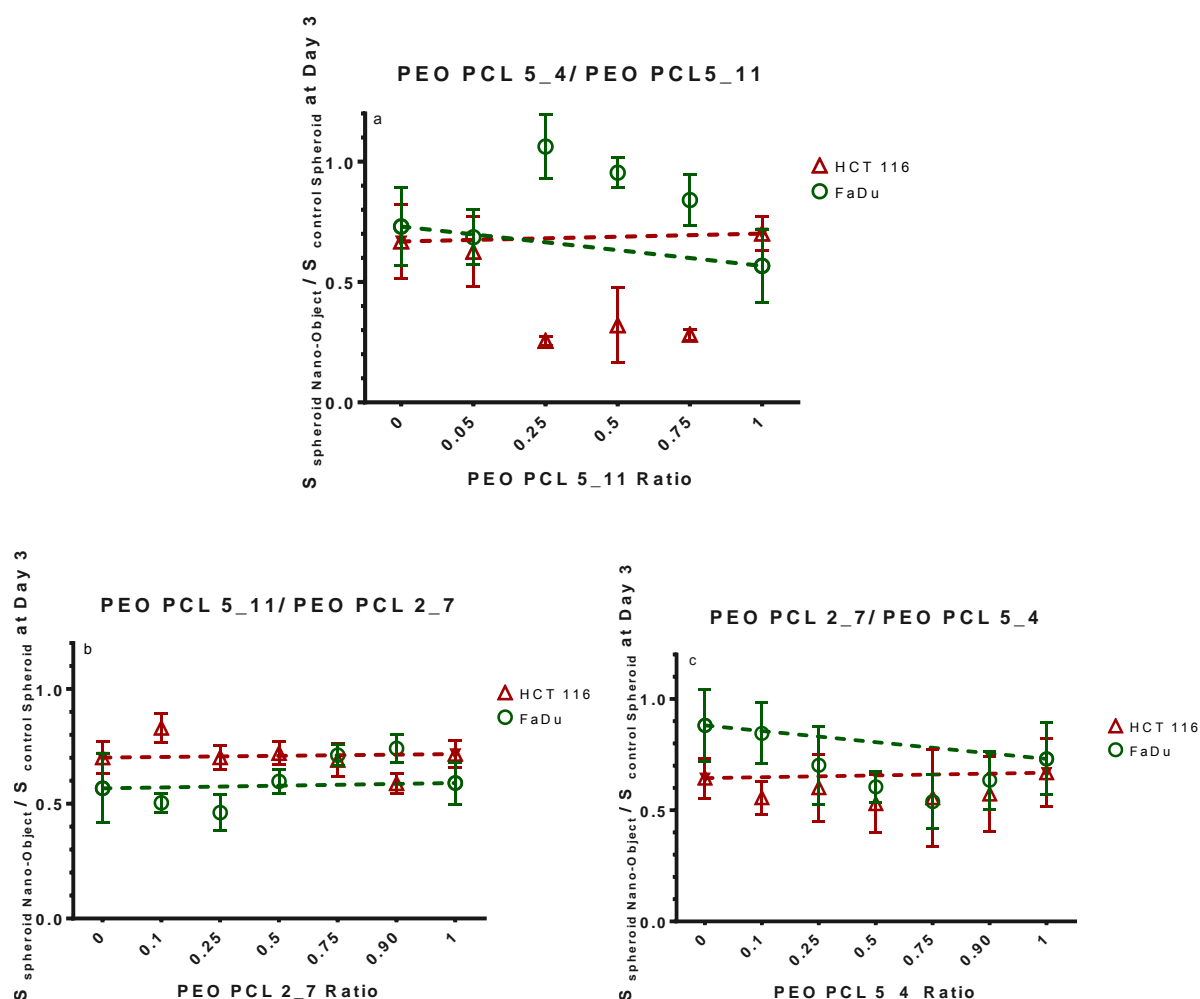
Pour le cas des mélanges PEO-PCL 5 000-11 000 / PEO-PCL 5 000-4 000 sur les cellules FaDu, seule une petite différence est visible entre le contrôle et le traitement PDT, sauf pour le rapport 5/95 où une très légère différence statistique apparaît. Cela est tout à fait surprenant, puisque les micelles PEO-PCL 5 000-4 000 ont seulement une petite efficacité PDT sur sphéroïdes FaDu.

Parmi tous ces systèmes, les plus efficaces semblent être ceux qui utilisent des mélanges incorporant le PEO-PCL 2 000-7 000 sur les cellules FaDu, où une diminution de la taille du sphéroïde est clairement observable pour certains ratios. Aucune des conditions n'a conduit à la disparition complète du sphéroïde, cependant aucun exemple dans la littérature à notre connaissance ne propose la disparition complète d'un sphéroïde en PDT.

Afin de mieux visualiser les éventuels effets de mélange, les résultats précédents ont été analysés au jour 3, en fonction du rapport entre les polymères du mélange (fraction du deuxième polymère dans le mélange)(Figure IV-9). Le paramètre rapporté sur ces graphiques représente le rapport entre les surfaces sphéroïdales du contrôle et du mélange de polymère considéré. Une courbe en forme de cloche avec un minimum est un signe d'un mélange qui est plus efficace que les nano-objets purs, et de la manière inverse, une courbe avec une forme de cloche avec un maximum montre que le mélange est moins efficace. La ligne en pointillé est un guide montrant le comportement attendu si aucun effet de synergie n'était présent.

Parmi ces résultats, les cas des mélanges PEO-PCL 2 000-7 000 / PEO-PCL 5 000-4 000 sur HTC 116, PEO-PCL 5 000-11 000 / PEO-PCL 2 000-7 000 sur les cellules FaDu ou HCT116 présentent un changement proche de ce qui serait attendu sans aucune synergie et non différenciable statistiquement de celle-ci. Le mélange PEO-PCL 5 000-11 000 / PEO-PCL 5 000-4 000 sur des cellules FaDu montre un antagonisme, l'effet du mélange étant moins efficace que la moyenne, sans qu'une explication puisse être donnée pour le moment.

Enfin, les cas les plus intéressants sont ceux du mélange PEO-PCL 2 000-7 000 / PEO-PCL 5 000-4 000 sur la lignée FaDu et PEO-PCL 5 000-4 000 / PEO-PCL 5 000-11 000 sur la lignée HCT 116. Un effet de synergie est observé, ce qui conduit à une meilleure efficacité de la PDT en utilisant les mélanges. Pour le premier, le meilleur rapport est de 25/75 massique. Dans ce cas, la présence des deux systèmes micellaires et allongés conduit à une meilleure efficacité PDT, ceci pourrait être expliqué par une meilleure pénétration du photosensibilisateur dans les cellules. Pour le deuxième cas, il est assez surprenant que le mélange micelles/vésicules conduise sur la lignée HCT116 à une forte synergie alors qu'un fort antagonisme était observé sur la lignée FaDu.



*Figure IV-9 : Comparaison de la taille des sphéroïdes contre les contrôles en fonction des ratios de polymères
a, Mélange PEO-PCL 5000-11000/PEO-PCL 5000-4000, b, Mélange PEO-PCL 5000-11000/PEO-PCL 2000-7000, c, Mélange
PEO-PCL 2000-7000/PEO-PCL 5000-4000*

Dans la littérature, à notre connaissance, aucune autre étude à ce jour n'a examiné l'influence de la présence de différentes morphologies de vecteur dans la même expérience. Nous ne pouvons donc discuter de ce point.

Cependant, l'influence de la taille est bien connue [46], il a ainsi été montré que l'effet EPR par exemple dépend grandement du couple taille du nano-objet/lignée cellulaire de la tumeur. De plus l'influence de la forme est de plus en plus caractérisée. En effet, plusieurs études ont suggéré que les nanovecteurs allongés pourraient être plus efficaces dans le cas de la pénétration intra et intercellulaire, du déplacement dans les vaisseaux ou de la résistance au système immunitaire [272]. Les nano vecteurs non sphériques se sont révélés avoir une plus longue durée de circulation, et il a été démontré que le processus de margination obligatoire pour leur sortie du flux sanguin dépend de la forme [280].

Dans notre cas, les vecteurs de PEO-PCL 2 000-7 000 de forme allongée n'ont cependant pas conduit à une efficacité accrue par rapport à ceux sphériques (soit micelles ou vésicules).

L'expérience présentée ici mesure un rendement global incluant plusieurs paramètres, tels que la migration du vecteur à l'intérieur du sphéroïde, la pénétration de l'agent photosensibilisant dans la cellule, la génération d'espèces réactives de l'oxygène sous irradiation, la réaction de ces derniers avec leur environnement. Afin d'examiner pleinement l'influence de la forme pour les vecteurs PDT, une autre étude complète serait nécessaire, afin de déterminer les mécanismes d'entrée du photosensibilisateur dans les cellules.

En effet, des cas ont été observés dans la littérature où la charge est transférée à la membrane cellulaire, permettant sa pénétration sans sa cargaison [274]. Un mécanisme similaire expliquerait l'absence d'un comportement différent entre les vecteurs dans un cas aussi simple qu'un modèle 3D, le vecteur n'ayant qu'un effet de transport et non de migration intra ou inter-cellulaire. Cependant, le fait que les mélanges présentent des comportements soit neutres, synergiques ou antagonistes montre que les vecteurs ne sont pas éliminés à la surface de la première couche des sphéroïdes.

5. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'influence du polymorphisme des vecteurs en thérapie photodynamique sur sphéroïdes, et ce pour différentes raisons. La première était la méconnaissance de la pureté des objets utilisés couramment, la seconde l'efficacité du PEO-PCL 2000-4800 qui, comportant trois familles, s'était montré très efficace (comme montré dans le chapitre 3).

Pour cela, nous avons choisi différents nano vecteurs PEO-PCL, des micellaires, vésiculaires ou de morphologies semblables à des vers (worm-like). Nous avons d'abord démontré que l'AsFFFF était la méthode de choix pour caractériser la pureté des nano-objets, contrairement à la DLS en batch qui ne peut pas fournir de résultats sans ambiguïté pour les mélanges. De plus L'AsFFFF permet aussi d'analyser les chargements de chaque famille et donc la répartition et le transfert des principes actifs entre les différents vecteurs.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à analyser l'efficacité en PDT de ces mélanges. En ce qui concerne les tests PDT, le mélange de micelles et vésicules s'est avéré être le système le plus intéressant, mais dans le cas d'une seule des deux lignées utilisées, en présentant une synergie. Ceci a conduit à une augmentation thérapeutique de près de 60% par rapport à la théorie qui ne prendrait pas en compte un effet synergique. À ce stade, seules des hypothèses peuvent être proposées, en lien avec une amélioration des processus de migration ou de pénétration en présence des deux types de morphologies.

Chapitre 5 : *PICs*

V. *PICs*

1. Introduction

Les PICs (complexes poly-ioniques) sont, comme détaillé dans la partie bibliographique, des objets récents dans leur utilisation et qui ont de nombreux intérêts tels que leur sensibilité au pH et leur capacité à encapsuler des molécules chargées par interaction électrostatique. Cependant, par la nature même de leur constitution, ces objets sont plus sensibles et fragiles que les auto-assemblages produits par des copolymères amphiphiles, pouvant se dissocier en présence de sel ou à certains pH. Cette sensibilité est à la fois un avantage et est recherchée pour le design de vecteurs stimulables, mais doit être contrôlée pour éviter toute dissociation inopinée. Celle-ci rend ainsi leur analyse et leur séparation plus complexe.

Comme dans les chapitres précédents, nous avons donc cherché à analyser différents objets de type PICs par FIFFF en plus de l'analyse DLS. Quelques exemples d'analyse [184, 281, 282] de PICs par AsFIFFF ont été décrits dans la littérature, uniquement sur des systèmes à très haute masse molaire ou à très forte interaction électrostatique ce qui n'est pas notre cas. Nous avons donc cherché à améliorer la méthode d'analyse nous permettant d'apporter des éléments concluants à la connaissance de ces assemblages.

Différents polymères ont été utilisés pour former les auto-assemblages (Figure V-1, Tableau V-1, Tableau V-2), ayant soit des groupes acides (poly(oxyde d'éthylène-b-acide acrylique PEO-PAA ou l'acide polyacrylique PAA) soit ammonium (Polylysine, DGL, Poly(chlorure de 3-acrylamidopropyl triméthylammonium - b - N - isopropyl acrylamide) PAPTAC-PNIPAM). Le DGL quant à lui est une forme de dendritique ramifiée (dendrigraft) de polylysine. Ceux-ci ont été choisis afin d'avoir une gamme de masses molaires et des architectures variées.

Les copolymères PEO-PAA ont été systématiquement caractérisés par GPC et RMN ^1H malgré la fiche technique fournie par Polymer Source. Les masses molaires mesurées nous ont conduit à changer l'appellation de certains. Les différents PICs ont été formés par mélange direct des deux solutions des constituants à un pH approprié. Les paires étudiées ont été PEO-PAA / Polylysine, PEO-PAA / DGL et PAPTAC-PNIPAM / PAA. Sauf indication, les rapports entre acides et amines ont été fixés à 1.

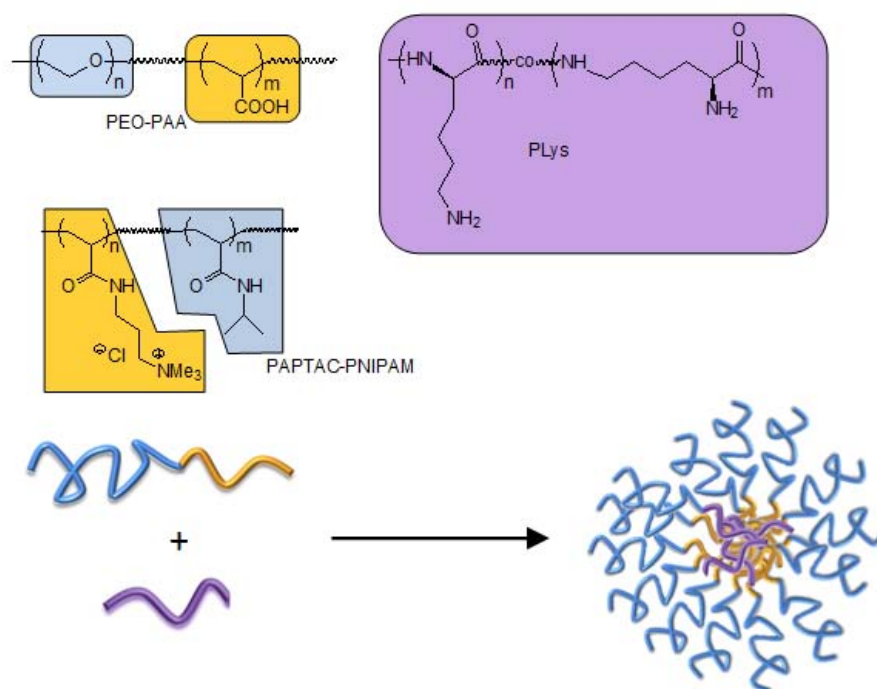


Figure V-1 : PICs et polymères utilisés pour leur formation

Nom	Mn bloc 1	Mn bloc 2
PLys	70000	-
DGL3	18700	-
PAA 10	10000	-
PAA 1	1000	-
PAPTAC-PNIPAM 1-9	1000	9000
PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1	16900	3100

Tableau V-1 : Polymères utilisés et dénomination

Nom PEO-PAA	masse molaire annoncée par le fournisseur	M _w mesurée par SEC	M _n mesurée par SEC	M _n mesurée par RMN ¹ H	f _{PEO} exp	Nom du polymère
5-56	61000	44900	43800	5000-38000	0.12	PEO-PAA 5-38
6-17.5	23500	78900*	32200*	6000-12000	0.33	PEO-PAA 6-12
6-3	9000	9000	8000	6000-2900	0.67	PEO-PAA 6-3
6-6.5	12500	19000	14300	6000-6000	0.5	PEO-PAA 6-6.5
11-6	17000	21600	12900	11000-4000	0.73	PEO-PAA 11-4
22.5-7.5	30000	134000*	49700*	28600-21100	0.58	PEO-PAA 28.6-21.1

Tableau V-2 : Copolymères PEO-PAA et caractérisation * Système bimodal

2. Analyses classiques et leurs limites

La formation des assemblages a été tout d'abord confirmée par DLS en batch (Tableau V-3). Le tableau 2 présente deux types d'analyses de DLS, le premier étant celui obtenu à partir du programme Malvern, et le second a été obtenu à partir des données Malvern, retraitées par le logiciel STORMS (évoqué dans le chapitre 4) qui permet des ajustements plus fins des paramètres. Les deux types d'analyse montrent des résultats assez proches pour l'analyse en intensité. Pour l'analyse en nombre, l'écart peut aller jusqu'à environ 25%, ce qui s'explique par la théorie utilisée pour ce calcul. En effet, le logiciel Malvern utilise par principe la théorie de Mie alors que plusieurs choix sont possibles dans STORMS. Pour le cas des PICs, selon leur taille, les équations de la diffusion de Rayleigh ou de Mie ont été utilisées.

En ce qui concerne la taille des PICs, on observe une plage de taille comprise entre 25 et 250 nm, on obtient donc facilement une grande diversité d'objets. La dispersité des auto-assemblages est variée, allant de systèmes très bien définis comme le PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1/PAA10 ou d'autres à très grande dispersité, voire multi-modaux comme le PEO-PAA 11-4 / DGL3.

PIC	DLS size _{int} (nm) Malvern	DLS size number (nm) Malvern	PDI Malvern	DLS size _{int} (nm) Storms	DLS size number (nm) Storms
PEO-PAA 5-38 / PLys	99	46	0.18	90	44
PEO-PAA 5-38 / DGL3	178	111	0.10	166	132
PEO-PAA 6-3 / DGL3	43	27	0.18	42	32
PEO-PAA 6-6.5 / DGL3	59	38	0.13	58	42
PEO-PAA 6-12 / DGL3 ^a	97	68	0.07	92	86
PEO-PAA 28.6-21.1 / DGL3	54	30	0.15	50	36
PEO-PAA 11-4 / DGL3 ^b	55/640 ^c	26	0.36	52/174 ^c	36
PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1/PAA10	228	199	0.003	222	210
PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1/PAA 1	269	184	0.10	252	204
PAPTAC-PNIPAM 1-9 / PAA 10	79	48	0.15	75	58

Tableau V-3 : Analyse DLS des assemblages courants. ^a PICs à ratio acides/amines 0.9 ^b PICs à ratio acides/amines 0.75 ^c la deuxième population représente environ 15% sur l'analyse en intensité

Comme dans les chapitres précédents, cette analyse DLS a été complétée par une caractérisation en fractionnement flux force. Sur la base de notre expérience sur les auto-assemblages amphiphiles, certains des PICs formés ont tout d'abord été évalués par AsFFFF. Les fractogrammes obtenus ont été très erratiques, jusqu'à conduire à l'absence de pics après élution. Afin d'évaluer ce problème, différents réglages ont été testés en changeant la taille de la cellule, l'espaceur, ou le programme d'élution. Cela n'a pas conduit à une amélioration. Des tests de recouvrement ont également été effectués en mesurant les surfaces des pics réfractométriques et ont révélé une sensibilité des objets à l'étape de focus (Tableau V-4). On remarque dans ce tableau que dès l'ajout de focus, 50% des objets ont été détruits ou disparaissent (une analyse du flux croisé aurait été nécessaire) à l'analyse et ce avec des taux de focus bien inférieurs aux taux nécessaires pour une analyse correcte avec une relaxation des objets. Par conséquent, pour ces types d'auto-assemblages, l'AsFFFF ne semble pas convenir.

PIC	Focus	RI surface des pics
PEO-PAA 5-38 / PLys	0	$2.9 \cdot 10^{-6}$
	0.1	$1.9 \cdot 10^{-6}$
	0.2	$1.8 \cdot 10^{-6}$
PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1/PAA10	0.1	$1.6 \cdot 10^{-6}$
	0.2	$1.2 \cdot 10^{-6}$
	0.5	$1.5 \cdot 10^{-6}$
PAPTAC-PNIPAM 16.9-3.1/PAA 1	0.1	$2.7 \cdot 10^{-6}$
	0.2	$1.0 \cdot 10^{-6}$

Tableau V-4 : Premiers essais en AsFIFFF

On concevra cependant aisément la sensibilité de ces objets, maintenus uniquement par des forces électrostatiques. A des flux croisés importants ils sont plaqués contre une paroi de cellulose régénérée avec laquelle il leur est possible de faire des interactions car la cellulose est connue pour ses possibles charges [C.R. Bria]. Cependant c'est plus la présence du focus qui semble dans ce cas précis être l'élément déclencheur du problème.

Mais cette étape, grâce aux travaux de M.Moon n'est pas une nécessité en soi et la possibilité d'une méthode plus douce est offerte par la technique de Frit-inlet, ainsi la relaxation hydrodynamique a toujours lieu mais l'étape de focus disparaît au profit d'une relaxation durant le trajet dans la cellule. La possibilité de travailler sur ce genre de cellule nous a été donnée grâce à une collaboration avec K. Williams au laboratoire des Mines de Golden (Colorado, USA).

3. Analyse Frit-SyFIFFF à Golden

Le SyFIFFF est [Bibliographie p 37] une cellule identique à celle de AsFIFFF si ce n'est que l'entrée du flux croisé se fait de façon continue tout au long de la cellule par un fritté au dessus de la cellule. Il est donc plus facile d'avoir des problèmes de bulles et de mouillage inégal sans pouvoir les repérer, et ces cellules sont aussi connues pour disperser plus facilement les pics et avoir un rendement légèrement inférieur à cause du fritté tout au long de la cellule. Cette technique implique aussi la nécessité de plus de pompes (une pour le flux croisé, une pour le frit inlet, et une dernière pour l'injection). Cependant le SyFIFFF permet d'avoir un très bon contrôle sur le flux croisé et la linéarité de celui-ci dans la cellule ainsi que sur les possibles paliers que l'on peut imposer au système.

Le montage que nous avons effectué est représenté dans la Figure V-2 avec les contrôleurs de pressions qui ont été apposés sur le système et les différents flux et analyseurs.

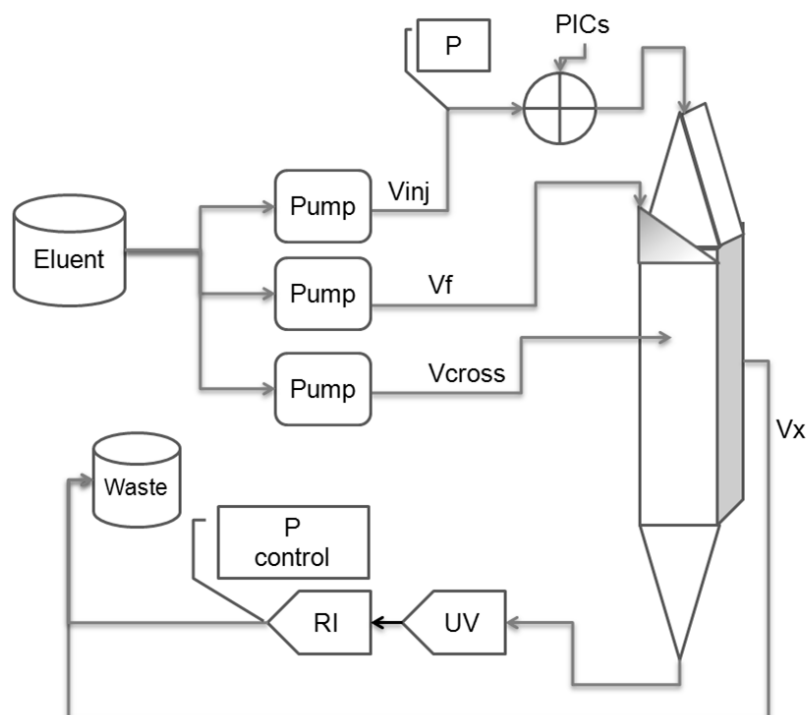
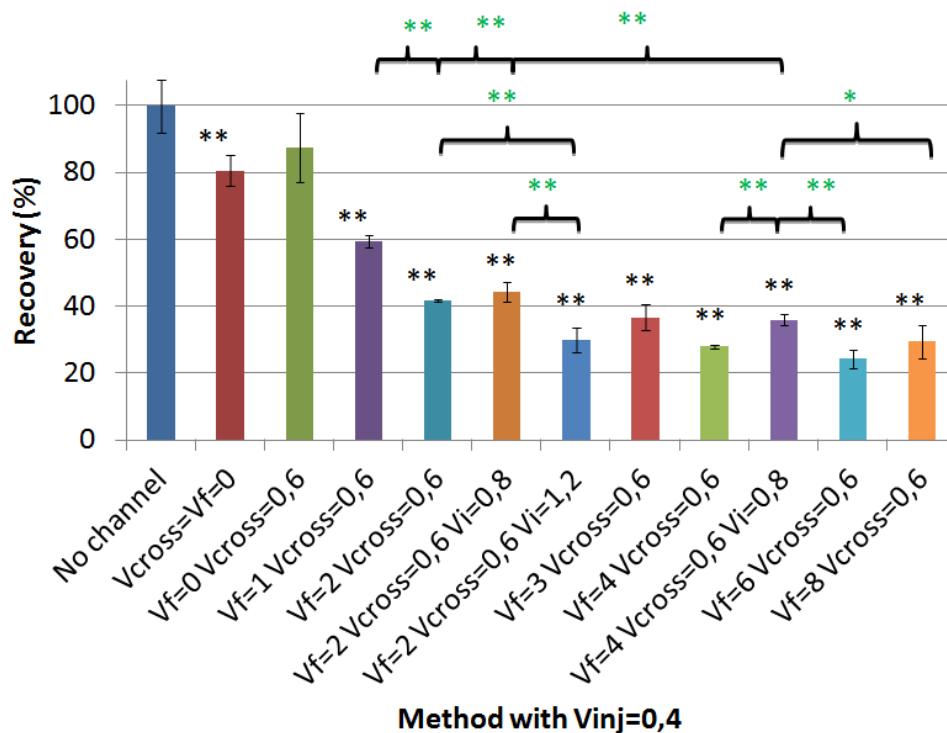


Figure V-2 : Système d'analyse Frit-SyFIFFF de Golden

Sur la base des difficultés rencontrées avec les PICs par AsFIFFF, des tests de recouvrement ont été effectués pour un PIC modèle, à savoir le PAPTAC-PNIPAM 1-9 / PAA10. La surface du pic RI a ainsi été enregistrée pour différentes conditions d'élution (Figure V-3). La superficie maximale théorique a été obtenue en l'absence du canal et a été utilisée comme référence.



*Figure V-3 : Recouvrement avec le PAPTAC-PNIPAM 1-9/PAA 10,
Test de Dunnett (Noir) ** $p < 0.01$, Test de Tukey : entre différentes colonnes (Vert) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
Avec Vc=Cross flow (Vx), Vi= Vinjection fixé à $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sauf indication, Vf=Vfrit*

L'ajout du canal conduit à une diminution de 20% de la surface du pic de PIC ($V_c = V_f = 0$). L'ajout d'un flux croisé (V_c) à $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ n'a pas conduit à une nouvelle baisse, et cette valeur a donc été choisie pour toutes les expériences. On semble voir d'ailleurs une augmentation entre le pic avec et sans cross flow cependant la différence statistique n'est pas significative et l'augmentation peut donc être mise sur le compte de l'incertitude des deux mesures qu'il est difficile de réduire avec le matériel à notre disposition.

Pour le cas du débit d'injection (V_i) il ne peut excéder $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sans créer une perte considérable et statistiquement significative de recouvrement. De plus $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ semble un bon compromis et a été testé mais ne peut être choisi facilement car il nécessiterait un débit de frit inlet V_f supérieur car il faut $V_f > 7V_{inj}$ pour que le frit ait un effet de relaxation acceptable. Un débit d'injection à $0,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a donc été choisi.

Enfin, le débit V_f utilisé dans le dispositif d'entrée Frit a été observé comme ayant une forte influence sur la récupération des objets. Le recouvrement a diminué jusqu'à ca. 30% pour $V_f = 4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. au-delà de cette valeur, une stabilisation de la valeur du recouvrement a été observée; V_f a donc été fixé à $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ car il limite la diffusion des molécules dans le canal (pic pas trop étalé), une pression pas trop importante dans la cellule qui pourrait gêner les détecteurs, et un flux assez important pour permettre la relaxation hydrodynamique.

La mise au point de l'élution sur le système de Golden nous a permis de réaliser des tests préliminaires d'analyse de PICs PAPTAC-PNIPAMA / PAA encapsulant différents actifs de PDT sélectionnés pour leur charge et leur plus ou moins grande solubilité dans l'eau : la Chlorine E6 (CIE6),

l'Aluminium phthalocyanine disulfonate (Alphth S2) et l'Aluminium phthalocyanine tétrasulfonate (Alphth S4). Ces analyses ayant été réalisées sans détecteur MALS ou QUELS ne sont pas interprétables facilement, elles ne seront pas décrites ici. Les indications semblaient indiquer une absence d'encapsulation de l'Alphth S4 et une encapsulation partielle pour les autres photosensibilisateurs. Ce point sera repris par la suite.

Nous avons donc pu développer une technique d'analyse permettant l'élution des PICs PAPTAC-PNIPAM avec un système de frit-inlet SyFFFF. Le taux de recouvrement de 40% obtenu permet d'envisager l'analyse de PICs jusqu'alors impossible dans un canal classique d'AsFFFF. Pour espérer atteindre des taux de recouvrement plus élevés, des essais avec une cellule FI-AsFFFF. Même si le taux de recouvrement obtenu sur le système de Golden peut paraître faible, on était en droit de s'attendre à une augmentation de celui-ci en passant sur les cellules industrielles du Frit-AsFFFF.

4. Analyse FI-AsFFFF à Purpan

a. Recouvrement et différents PICs

Un transfert de méthode a ensuite été effectué vers le FI-AsFFFF de Purpan, nous avons donc créé une nouvelle méthode plus adaptée à cette machine en nous fondant sur les possibilités que nous avions montrées à Golden.

Les mêmes tests de recouvrement ont donc été menés avec le même PIC (Tableau V-5) avant de passer à d'autres polymères. On retrouve ici la même tendance à la baisse du taux de recouvrement avec l'augmentation du flux croisé. Le V_{inj} étant fixé à 0.2 mL/min et permettant d'être certain de l'efficacité du frit, il n'a pas été changé. De même le V_c est conservé à 1 mL.min⁻¹ dans le but d'avoir un bruit de fond le plus faible possible, un rendement supérieur à 70% ainsi qu'un pic bien défini et séparé du pic d'injection.

PIC PAPTAC-PNIPAM/PAA 1-9/10	
V_x (mL.min ⁻¹)*	Recouvrement %
2-0,5	76,8
2-1	76,6
3-1	36,1
4-1	73
4-2	70
2	72,1
3	59,9
4	68
5	61,8
6	44,6

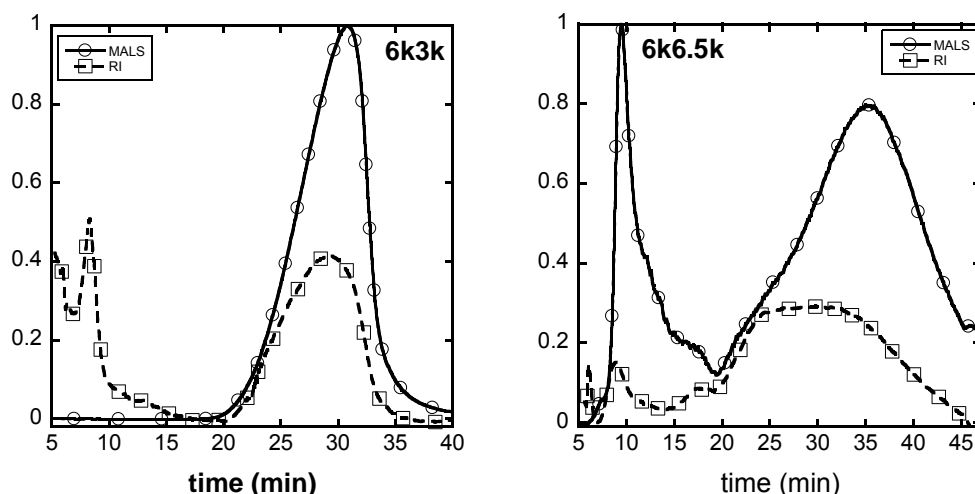
*Tableau V-5 : Choix de la méthode d'analyse et recouvrement. * utilisation de plusieurs paliers de flux*

Il est intéressant d'observer aussi l'augmentation du taux de recouvrement avec les paliers de flux croisé permettant d'atteindre un bon taux de recouvrement supérieur à 70%. La méthode est aidée par la conformation de la cellule comme expliqué dans le chapitre bibliographique. Ainsi quoi qu'il arrive, le recouvrement est toujours supérieur à celui obtenu sur le FI-SyFIFFF, et ceci malgré le fait que le degré de liberté sur les contrôles soit moindre car nous n'avons ici que trois paramètres (V_{inj} , V_x et V_c) ce qui est toujours lié à la conformation de la cellule. Ainsi le V_x (V en sortie sous le frité) et le V_f sont intimement liés (V_f étant la seule autre entrée de flux en plus de V_{inj}) d'autant qu'un $V_{inj} < V_f$ reste nécessaire.

Tous les PICs ont ainsi été analysés par cette méthode pour un rapport stœchiométrique entre fractions acides et basiques. Les résultats sont présentés dans le Tableau V-6 et la Figure V-4. On observe pour tous les objets sauf le PEO-PAA 11-4 / DGL3 de très bons taux de recouvrement. Ces derniers sont toujours supérieurs à 70% et très supérieurs à ceux obtenus avec un focus ou avec la cellule de Fi-SyFIFFF.

Polymère 1	Polymère 2	Recouvrement (%)	R_h (nm)	R_g (nm)	R_g/R_h	M_w (10^6)
DGL3	PEO-PAA 6-3	99	27	17	0.62	3
	PEO-PAA 6-6.5	100	148/69	64/36	0.43/0.52	11/4.5
	PEO-PAA 11-4 ^a	40	107/35	32/21	0.3/0.6	0.2/1.7
	PEO-PAA 28.6-21.1	80	193/98	65/25	0.34/0.25	1.8/4.2
	PEO-PAA 6-12 ^b	97	35	25	0.71	42
	PEO-PAA 5-38	71	38/53	26/46	0.68/0.87	53/288
PAPTAC-PNIPAM 1-9	PAA 10	77	50/100/200	<10/30/40	-/0.3/0.2	0.04

Tableau V-6 : Analyse FI-AsFIFFF des différents objets. a ratio acides/amines de 0.76 b ratio acides/amines de 0.9



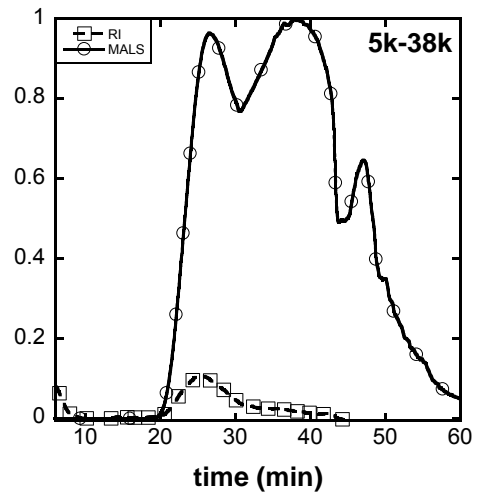
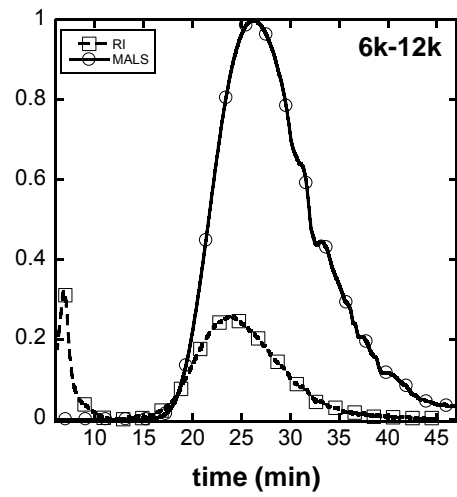
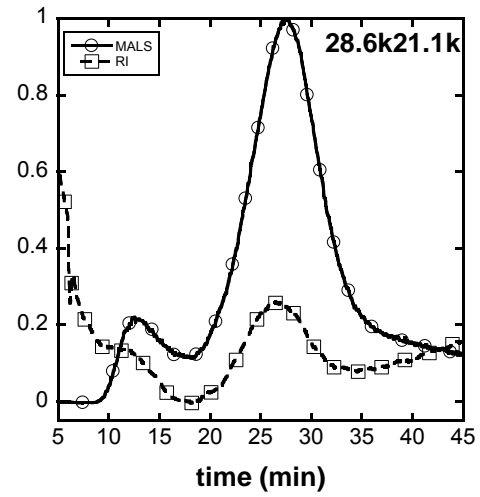
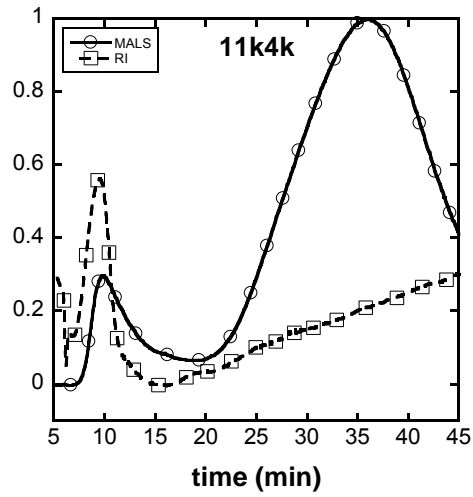


Figure V-4 :Analyse de différents PICs DGL 3/PEO-PAA

Analyse obtenue avec $V_x=2-0.5$ et un espaceur de $350\ \mu\text{m}$ (taille M) pour tout les objets sauf PEO-PAA 5-38 et PAO-PAA 6-12 qui sont obtenus avec un espaceur de 250M .

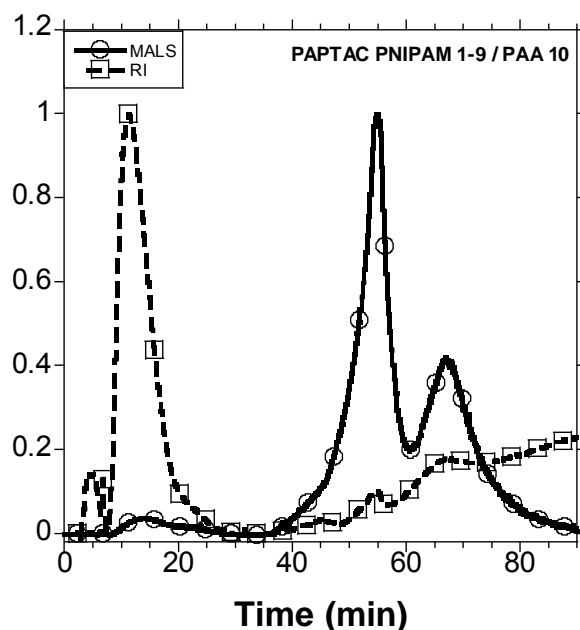


Figure V-5 : Analyse du PIC PAPTAC-PNIPAM/PAA 1000-9000/10 000

Pour les PICs à base de PEO-PAA 6-3 et 6-12, un pic résiduel de DGL à 6,5 minutes peut être observé et la formation de PIC est mise en évidence par la présence d'un pic majeur d'élution autour de 20-35 minutes.

Pour tous les autres systèmes, les PICs ont été observés comme des populations doubles. Les R_h , R_g et M_w correspondants sont également rapportés dans le Tableau V-6. Si la récupération de tous les systèmes est élevée, les résultats des tailles obtenues sont quelque peu surprenants. En effet, la technique FI-AsFFFF pour cette gamme de nano-objets devrait éluer les nano-objets en fonction de leur volume hydrodynamique, ce qui signifie que dans le domaine d'élution normale, les petits objets doivent éluer plus vite que les plus grands. Ici, il est très surprenant que les nano-objets de ca. 100-200 nm aient été observés pour des temps d'élution aussi petits que 9-10 min, tandis que des objets PICs de 30-100 nm éluent après 25 minutes.

Les différentes interactions possibles entre les petits et les grands PICs et la membrane pourraient constituer une explication partielle de ce comportement, si les compositions chimiques des deux systèmes sont différentes. En effet, il est à noter qu'il n'a pas été possible d'observer l'élution de copolymères PEO-PAA seuls hors de la cellule FFF, bien que le seuil de coupure de la membrane soit inférieur à leur taille.

La FI-AsFFFF couplé RI-MALS donne également accès au rapport R_g / R_h , relatif à la morphologie du nano-objet. Les PICs dans la littérature ont été observés pour présenter des rapports R_g / R_h de 0,3 à 1,3, en fonction de la morphologie coeur-écorce plus ou moins définie et de la densité du noyau [96]. Ainsi, les valeurs trouvées dans ce travail sont en accord avec les valeurs de la littérature.

Enfin, l'analyse par FI-AsFIFFF du PIC à base de PAPTAC-PNIPAM montre elle aussi la présence de plusieurs pics, dont les rayons hydrodynamiques vont de 50 à 200nm. Le rapport R_g/R_h pour les plus gros objets a pu être analysé et est inférieur à 0.3, signe d'assemblages très denses

Afin d'aller un peu plus loin dans la réflexion, il est intéressant de comparer les données obtenues en DLS avec celles de la FFF. La première remarque est le nombre d'objets qui comportent deux populations ou plus en fractionnement flux force et qui n'en comportent qu'une en DLS. S'il est possible que les flux, même faibles, aient un impact sur les objets, on s'attendrait à ce que ces changements soient plutôt poussés dans les domaines des petits PAA peu analysés dans la littérature, hors ce n'est pas le cas.

C'est le PEO-PAA 6-3, comportant un seul pic de taille comparable, qui est le plus stable entre les données DLS et FI-AsFIFFF. Cependant le fractogramme montre un pic non gaussien et donc une répartition des tailles non idéalement répartie autour d'une moyenne mais plutôt bloquée à une certaine taille. Ceci pourrait expliquer la légère divergence entre les R_h QELS et les R_h de la DLS Batch dont la différence reste très faible. De même le PEO-PAA 6-12/DGL-3 comporte un seul pic majoritaire et ce dernier donne des résultats correspondant à ceux de la DLS batch. Le cas du PEO-PAA 11-4 semble aussi se rapprocher de la proposition de la DLS avec un gros objet à $R_h(\text{batch})$ 87nm et à $R_h(\text{FFF})$ 107nm et un plus petit à $R_h(\text{batch})$ 26nm et à $R_h(\text{FFF})$ 35nm. Cependant et même si les résultats font écho aux agrégats proposés par la DLS, la sortie du pic à 107nm et à un temps d'élution de 10min reste tout de même une question.

Les analyses des autres objets montrant (Tableau V-6), eux, deux pics, sont plus complexes. Pour le PEO-PAA 5-38/DGL-3 on peut aisément concevoir que la DLS ne distingue que le PIC minoritaire dans sa population mais de plus grande taille vu sa proximité avec l'autre pic du PIC au R_h de 38nm. Ainsi celui de $R_h=53\text{nm}$ correspondait bien avec le $D_h=111\text{nm}$ de l'objet batch. Il est à noter qu'un retraitement de ces données par STORMS peut laisser apparaître dans certains cas (paramètre de régularisation égal à 1 et paramètre de fenêtre d'analyse fixé à 1) une deuxième population ayant un rayon proche de 35-40 nm, correspondant à ce qui est observé en FFF. Toutefois, il est inconcevable qu'une analyse DLS en batch conduise spontanément à cette information, la plupart des retraitements effectués en modifiant volontairement les paramètres conduisant dans 95% des cas aux résultats présentés dans le Tableau V-2 montrant une population unique au-delà de la centaine de nanomètres.

Les deux derniers objets qui eux proposent des résultats étonnants sont bien moins comparables. Le PEO-PAA 6-6.5 ne fait jamais écho dans ses résultats à un petit objet de $D_h=42\text{nm}$ comme proposé en DLS batch. Quant au PEO-PAA 28.6-21.1, les résultats DLS montraient de petits objets avec un R_h de 25nm, ce qui est très différent de ce qui est observé en FFF avec une double population vers 200 et 100nm.

Ceci reste difficile à expliquer car la DLS en batch est plutôt connue pour donner des résultats supérieurs et faire disparaître une population de petite taille derrière un gros objet. Pourtant ici celle-ci semble avoir oublié les gros agrégats étonnamment trouvés en FI-AsFIFFF et sortir uniquement des petits objets avec une définition très acceptable si l'on oublie les résultats FI-AsFIFFF. Ceci semblerait indiquer que le fractionnement flux force ait pu conduire dans ce cas à la formation d'agrégats in situ.

b. Caractérisation en présence de Sel

Le chapitre bibliographique a évoqué le problème de stabilité des PICs en présence de sel. Nous avons donc caractérisé le PIC PEO-PAA 6-3/DGL3 en présence d'une concentration croissante de NaCl. Les solutions ont été analysées en parallèle par DLS en batch par B. Lonetti et Frit-Inlet AsFIFFF par moi-même. Les résultats de DLS sont présentés dans le Tableau V-7.

[NaCl]	DLS taille _{int} (nm)	% int	PDI int	DLS taille _{nombre} (nm)	PDI nombre	Intensité diffusée (u.a.)
0	42		0.39	32	0.19	13500
0.2	72	99	0.60	38	0.20	25800
0.6	166		0.23	124	0.20	140000
0.8	216		0.20	168	0.18	114800
1.0	1320 300	74 12	2.5	228	0.48	7000
1.5	1040 18	85 13	7.20	14	0.17	1300
2.0	410 22 10	58 17 13	1.2	9	0.15	1000

Tableau V-7 : Analyse DLS en batch de l'effet de la concentration du sel sur le PIC PEO-PAA 6-3 / DGL3

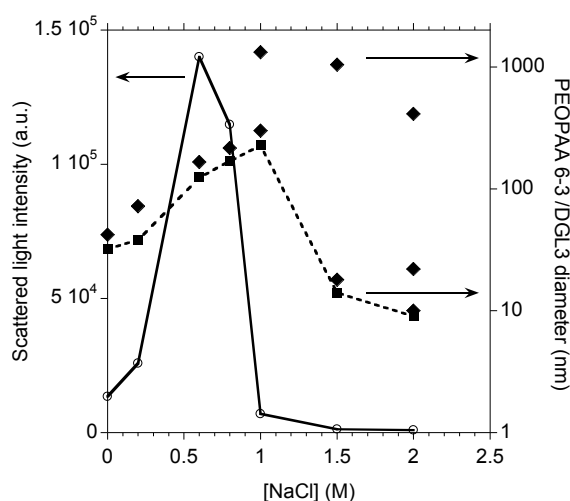


Figure V-6 : Influence de la concentration en NaCl pour la DLS Batch, cas du PEO-PAA 6-3 / DGL3. o: Intensité diffusée; ♦ Diamètre en intensité; ■ Diamètre en nombre

Après addition de NaCl, l'intensité de la lumière diffusée augmente pour des concentrations allant jusqu'à 0,6M, puis diminue pour atteindre des valeurs proches de zéro pour des concentrations supérieures à 1M. Les tailles relatives en intensité et en nombre ont augmenté pour de faibles

concentrations de sel, signe d'un gonflement de l'auto-assemblage, suivi de sa dissociation complète. Au-dessus de 1 M, l'analyse des corrélogrammes indique la présence de plusieurs populations de nano-objets, ce qui rend l'interprétation difficile. La comparaison entre l'intensité et les diamètres relatifs en nombre a montré que de très gros agrégats non contrôlés ont été formés en petites quantités. Ce comportement montre que l'addition de sel a fortement déstabilisé l'auto-assemblage, conformément à ce qui a déjà été décrit dans la littérature [96].

Le FI-AsFIFFF a été utilisé pour obtenir plus d'informations. Afin de limiter l'élution en présence de concentrations trop élevées de sel, et ainsi les dépôts possibles dans l'appareil (les PICs très salés ont tendance à se déposer dans les détecteurs) et pour pouvoir faire ces analyses dans des temps convenables, nous avons décidé que toutes les éluions FFF seraient effectuées dans l'eau pure.

Cela impliquait que les PICs étaient préparés dans de l'eau pure, puis exposés à des concentrations de plus en plus élevées de sel et ensuite élués par FFF dans l'eau pure. Par conséquent, il existe une différence entre les analyses par FI-AsFIFFF (échantillons dans des solutions de NaCl, mais élués dans l'eau pure) et celles de DLS Batch (échantillons dans des solutions de NaCl, analysés directement). Cela implique aussi que pendant l'élution, un processus de dessalage a lieu. Ceci doit être pris en compte pour la discussion, en particulier pour les solutions très concentrées pour lesquelles l'échantillon est constitué principalement de polymères solubles, le dessalage pouvant alors conduire à un ré-assemblage pendant l'élution (Figure V-7).

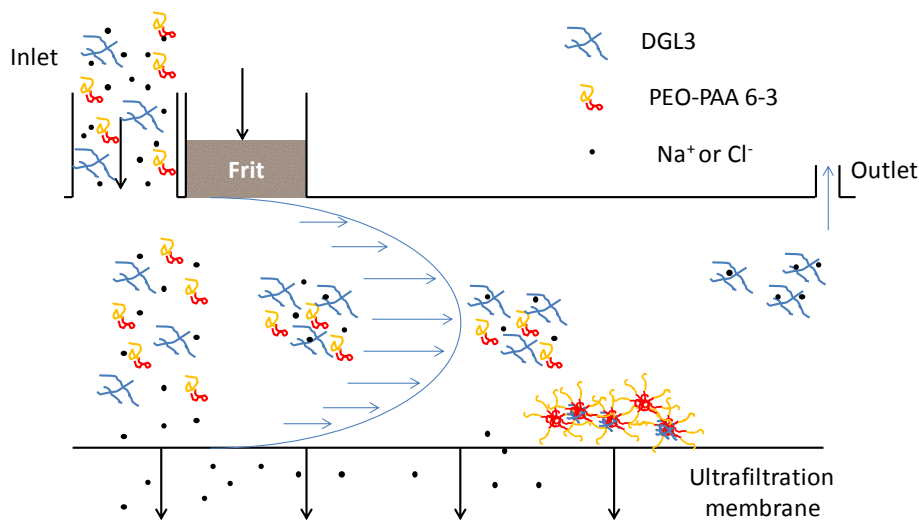
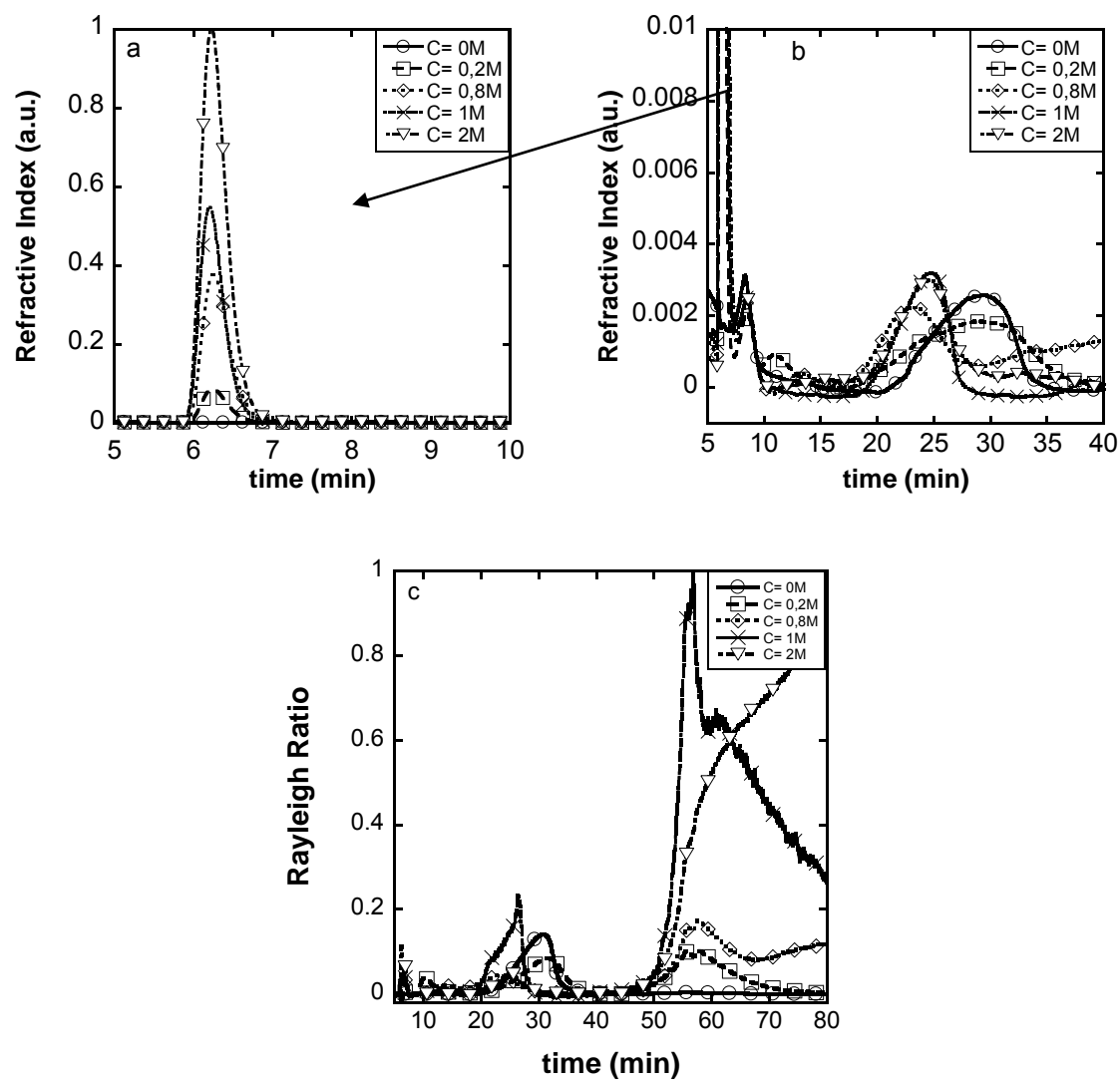


Figure V-7 : Elution en Frit-inlet FFF d'un système fortement chargé en sel

Afin d'évaluer le taux de ré-assemblage par dessalage, une expérience de contrôle a été réalisée par S. Gineste, où des solutions de NaCl de PICs PEO-PAA 6-3 / DGL3 ont été soumises à une dialyse et analysées par DLS à des moments différents. Les résultats montrent que pour de faibles concentrations de sel (0,2M), le PIC reste stable au processus de dessalage. Pour la forte concentration (2M), le dessalage conduit à la formation non contrôlée d'autoassemblage entre 15 et 60 min.

Les différents fractogrammes sont rapportés sur la Figure V-8 et les analyses en sont faites Figure V-9. L'augmentation de la concentration en sel conduit à trois processus concomitants: augmentation du pic de la DGL-3 à 6,8 min, déplacement du pic PIC vers les petits temps de rétention

pour des concentrations élevées de NaCl, et augmentation des signaux de diffusion de la lumière après 50 minutes d'élution.



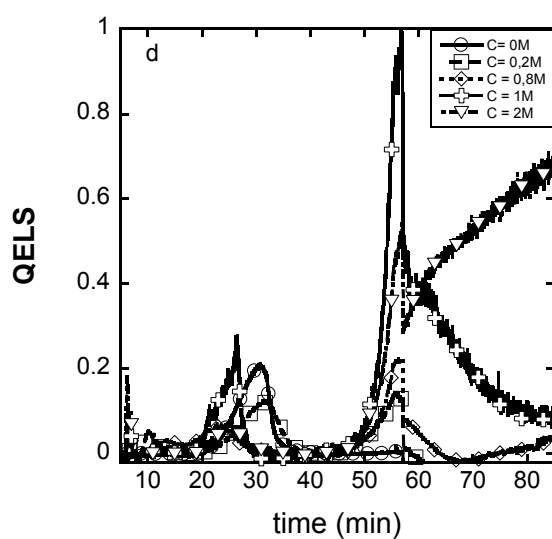


Figure V-8 : Etude de l'effet de NaCl sur les PICs PEO-PAA 6-3/DGL 3 avec $C=[NaCl]$. a et b : signal réfractométrique ; c : signal MALS ; d : signal QELS

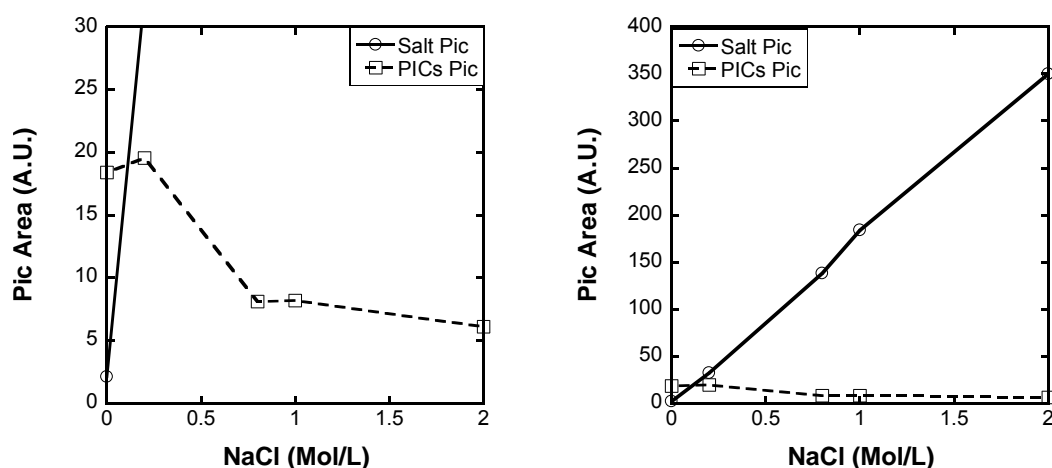


Figure V-9 : Etude des aires des pics pour le DGL 3 et le PIC PEO-PAA 6-3/DLG 3

[NaCl]	Pic 1		Pic 2	
	Temps d'éluion (min)	R_h (nm)	Temps d'éluion (min)	R_h (nm)
0	28	27		
0.2	28	27	56	100
0.8	23	40	58	80
1.0	24	"200"	>50	"200"
2.0	24	"200"	>50	"200"

Tableau V-8 : Analyse des fractogrammes par RI-MALS

L'augmentation continue et linéaire du pic DGL à 6-8 min est un signe d'éjection de DGL du PIC en présence de sel. Ce phénomène est déjà observé pour une concentration en NaCl de 0,2 M,

lorsque l'effet de dessalage n'a aucune influence sur la stabilité du PIC. En outre, à partir de la très forte intensité du pic par rapport à un DGL pur, on peut supposer que les ions chlorure ont également été associés au DGL. Si le DGL est éjecté du PIC, les nano-objets résultants qui ont été analysés présentaient donc une dérive dans la composition par rapport au rapport 1/1 idéal entre les amines de DGL-3 et les acides de PEO-PAA. Le rayon de giration et le nombre d'agrégation de l'auto-assemblage ne peuvent donc pas être déterminés puisque le dn/dc n'est pas connu.

Les agrégats qui ont été observés après 50 minutes sont visibles en raison de la diminution en flux croisé. Fait intéressant, bien que les données QELS instantanées (et les corrélogrammes associés) soient difficiles à interpréter, un diamètre hydrodynamique moyen de 400nm a été obtenu pour les pics après 50 minutes, ce qui est proche de la taille observée par DLS en batch dans l'analyse d'intensité relative.

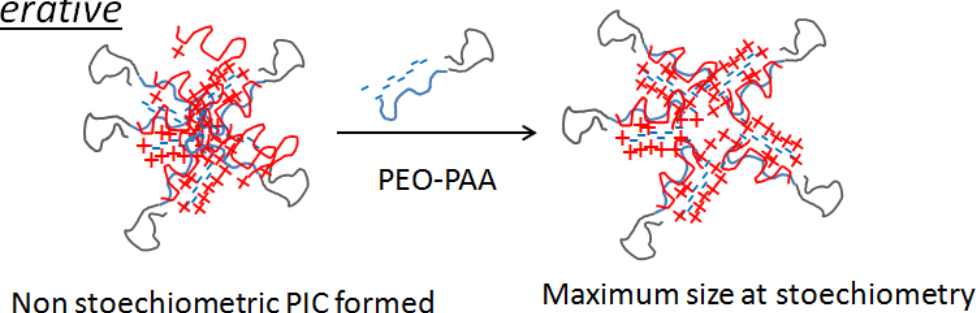
Les PICs à fort ratio de DGL, donc de charge positive ont plus de possibilités de faire des interactions avec la cellulose régénérée de la membrane (chargée négativement), les PICs après dessalage qui sont eux, déficients en DGL, seraient moins enclins à ces interactions (ou à faire des interactions de répulsion [283]) avec la membrane et sortiraient donc en premier lieu.

La seconde possibilité est liée à la reformation de ces PICs plus tardifs dans la cellule FI-AsFFFF. Ils sont moins soumis aux flux croisés et au ralentissement, on a donc des objets sortant à des temps plus courts sans pour autant être certains de l'influence de leur taille sur le comportement exact.

c. Assemblage des PICs en fonction du ratio

Parmi les travaux de la littérature [284, 285], deux mécanismes de formation des PICs sont décrits, dénommés coopératifs ou non coopératifs. Dans le cas coopératif, un PIC stœchiométrique est formé dès l'ajout minimal du deuxième polymère. La dimension des PICs formés ne change donc pas en fonction du ratio des deux polymères, c'est simplement le nombre de PICs stœchiométriques qui augmente avec le ratio. Dans le cas non coopératif, des PICs non stœchiométriques sont formés à faible ratio, et leur taille augmente jusqu'à atteindre la stœchiométrie.

Non cooperative



Cooperative

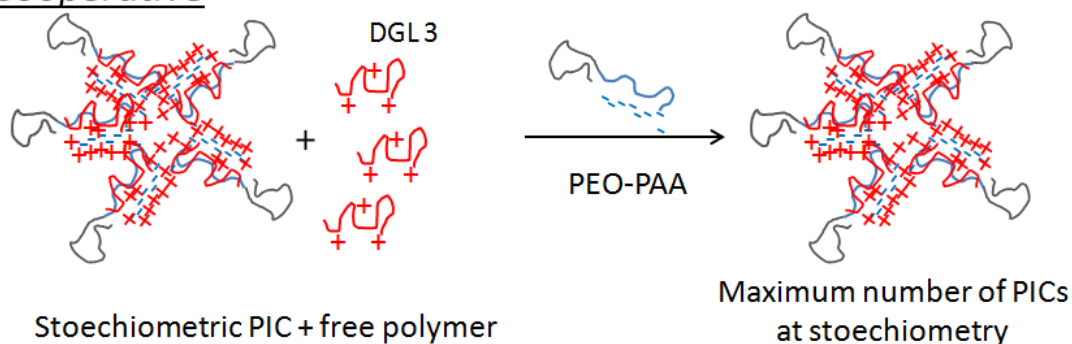


Figure V-10 : Processus de formation des PICs

Nous avons donc cherché à croiser les informations entre les analyses DLS en batch et la FI-AsFFFF afin de creuser cette problématique. Sur certains PICs PEO-PAA / DGL nous avons changé le ratio PEO-PAA / DGL en partant de zéro et en augmentant (ajoutant du PEO-PAA) jusqu'au ratio acide/amine 1 donnant la meilleure stabilité de PICs en moyenne.

Nous avons d'abord observé l'assemblage du PEO-PAA 6-3 avec la DGL-3 (Figure V-11). Plusieurs choses peuvent être observées, en premier lieu de 6 à 10 minutes le pic en RI descend petit à petit, c'est le pic de la DGL-3 qui disparaît pour former l'objet. Cependant ce n'est qu'à un ratio de 0.8 qu'on observe un brusque changement avec apparition d'un PIC en RI et MALS. De même pour le pic du PIC présent de 20 à 35 min, ce dernier n'apparaît vraiment qu'à un ratio de 0.8.

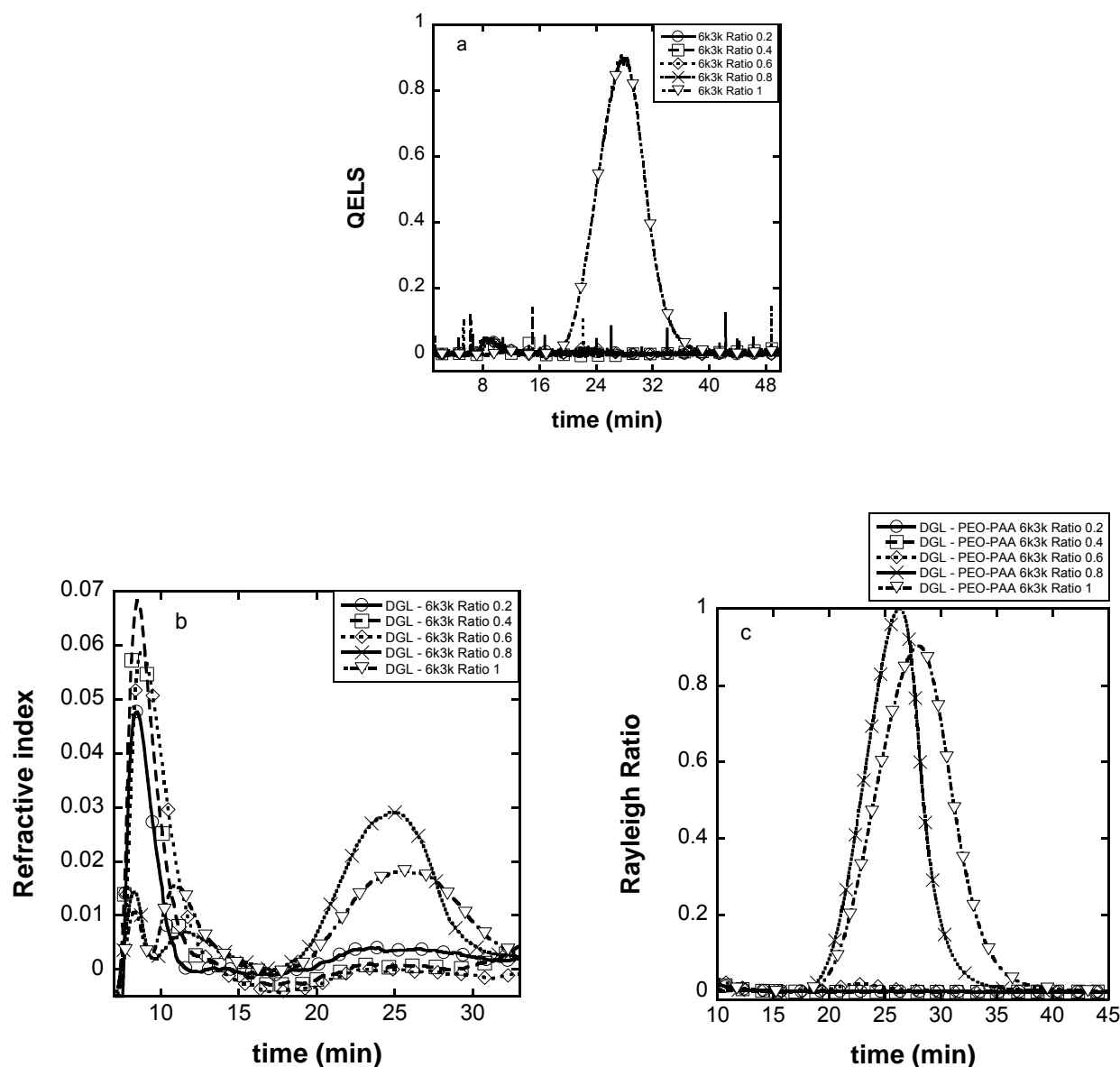


Figure V-11 : Influence du ratio unités acides / unités basiques sur la formation des PICs PEO-PAA 6-3/DGL 3, analyse par FI-AsFIFFF. a : QELS, b : RI, c : MALS

On peut donc dire que le PIC PEO-PAA 6-3/DGL-3 commence à se former dans des conditions détectables à partir d'un ratio 0.8 et grossit au ratio 1. Ceci peut être en accord avec un processus non coopératif.

Les analyses DLS en batch sur ces mêmes solutions ont montré la même évolution avec une intensité diffusée très faible jusqu'à un ratio de 0.8, associée à la formation d'objets à partir de celui-ci. L'apparition des objets est très brutale et pourrait être décrit par un ratio seuil de 0.8 au-delà duquel le PIC n'évolue que faiblement. A notre connaissance, ce processus non coopératif à seuil n'a jamais été décrit dans la littérature. Les diamètres hydrodynamiques en batch sont cohérents avec ceux obtenus par FI-AsFIFFF. Il n'est malheureusement pas possible d'obtenir une mesure fiable des rayons de

giration par la détection MALS étant donné que la composition chimique de l'assemblage change avec le ratio. De plus la mesure du dn/dc sur les PICs stœchiométriques ayant montré un incrément supérieur à la somme des incréments de chaque objet il n'est pas raisonnable d'évaluer ce paramètre grâce au ratio.

L'étude du PEO-PAA 6-12/DGL-3 (rapport acide/amine 0.9) a ensuite été effectuée car ces deux objets (PICs à base de PEO-PAA 6-3 et 6-12) étaient les seuls à être bien définis et monodisperses, elle est présentée Figure V-12.

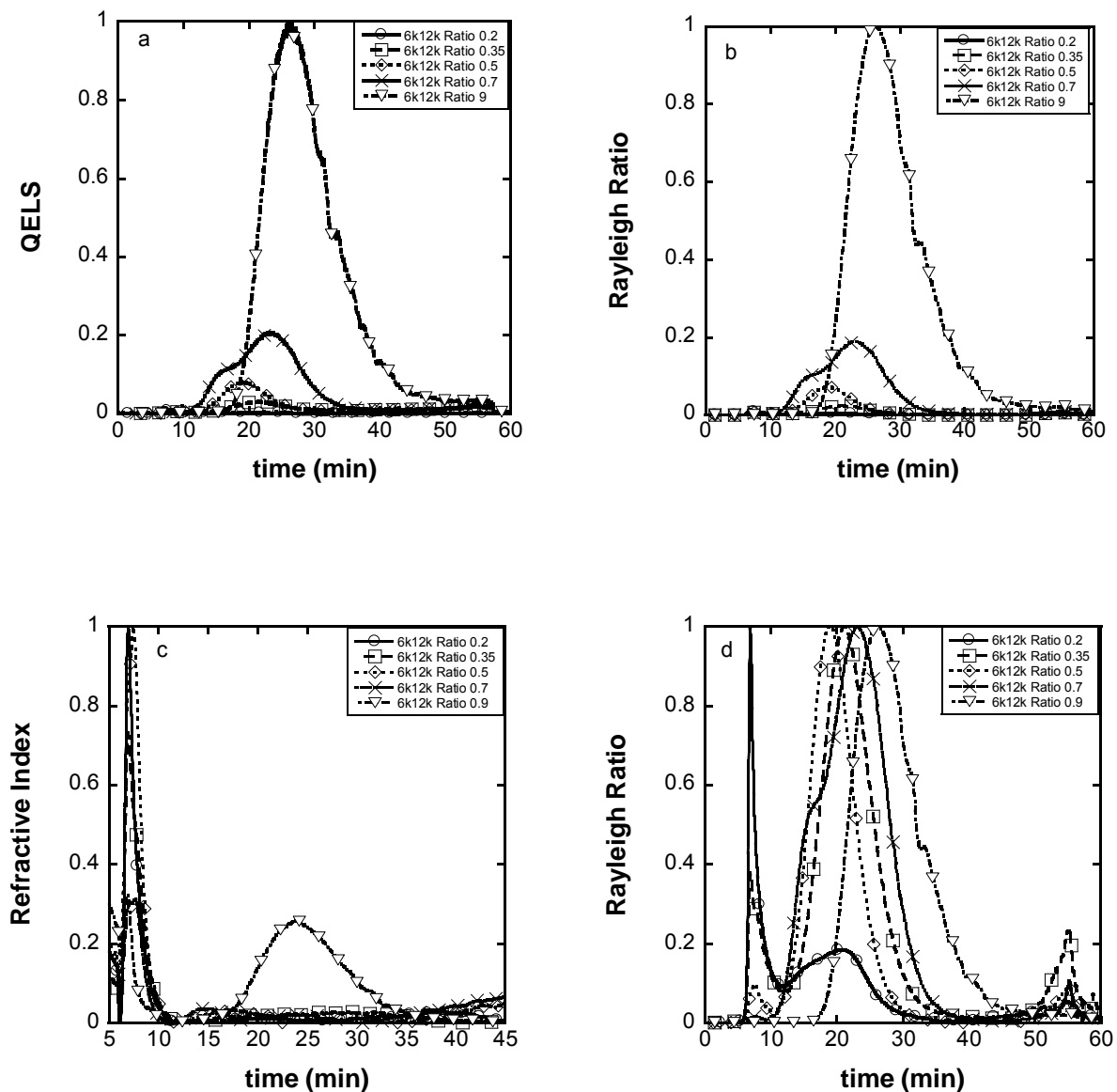


Figure V-12 : Etude de l'effet du ratio unités acides / unités basiques sur les PICs PEO-PAA 6-12/DGL 3

Le second Rayleigh ratio proposé met toutes les courbes à la même hauteur

a : QELS, b : MALS échelle normale, c : RI, d : MALS échelle relative

Lorsqu'on observe le RI, on ne remarque un véritable et notable changement que pour un ratio de 1 avec l'apparition d'un pic de PIC de 15 à 35 minutes. Cependant pour un ratio de 0.7 on peut voir la naissance d'un pic de 12 à 17 minutes toujours en RI corrélable avec une diminution du pic de DGL. L'intensité de ce pic étant très faible, le nombre d'objets reste marginal.

Pour le MALS et QELS, le comportement est très différent. A un ratio de 0,2, on observe déjà un assemblage de 10 à 25 minutes puis cet assemblage grandit petit à petit, alors que le pic du DGL est toujours présent. A 0,35, on observe un objet donnant un pic de 15 à 30 minutes, puis il diminue un peu en taille en faisant disparaître la DGL à 0,5. A un ratio de 0,7, le pic a un comportement très particulier, il est composé de deux objets, celui dont le RI a été observé de 12 à 17 min et celui de 15 à 35 min formant un épaulement. Enfin au ratio 0,9 on observe le pic attendu pour le PIC s'étendant longuement jusqu'à 40 min avec quelques épaulements après la disparition du pic RI. La taille augmente avec le ratio, indiqué à la fois par le déplacement du temps d'élution et l'accroissement du pic montrant une intensité diffusée croissante.

Le MALS étant beaucoup plus sensible pour les gros objets, il permet de voir un signal même si quelques objets sont présents, c'est le cas ici. Grâce à la FI-AsFIFFF, il semble que l'on observe la création de quelques objets qui changent de forme avec le ratio jusqu'à ce ratio de 0,7 où la création d'un certain nombre d'objets commence pour vraiment prendre une place prépondérante au ratio 0,9.

Les analyses DLS en batch ont montré dans ce cas une augmentation très forte de l'intensité diffusée pour des ratios supérieurs à 0,5. Cette augmentation non linéaire de l'intensité diffusée laisse supposer un processus non coopératif qui devrait donc donner des objets grossissant avec le ratio. Toutefois en analyse DLS batch, la taille observée reste globalement stable vers 80nm contrairement aux mesures effectuées par FI-AsFIFFF (Tableau V-9)

Les diamètres hydrodynamiques obtenus par FI-AsFIFFF sont cohérents pour les ratios 0,7 et 0,9. Pour le ratio 0,5, la FI-AsFIFFF donne un diamètre hydrodynamique de 50 nm alors que la DLS Batch a conduit à une taille d'une centaine de nanomètres. En modifiant les paramètres du fit sur STORMS, il est possible de faire apparaître la population centrée autour de 40nm en plus de celle à 100nm. Cependant la FI-AsFIFFF n'a pas mis en évidence de population à 100nm. On ne peut donc pas exclure que l'auto-assemblage pour ces derniers ratios soit sensible au flux.

Enfin nous avons étudié la croissance du PIC PEO-PAA 5-38/DGL-3 dans l'optique d'avoir un large spectre de PICs et d'essayer de comprendre le plus possible de comportements (Figure V-13).

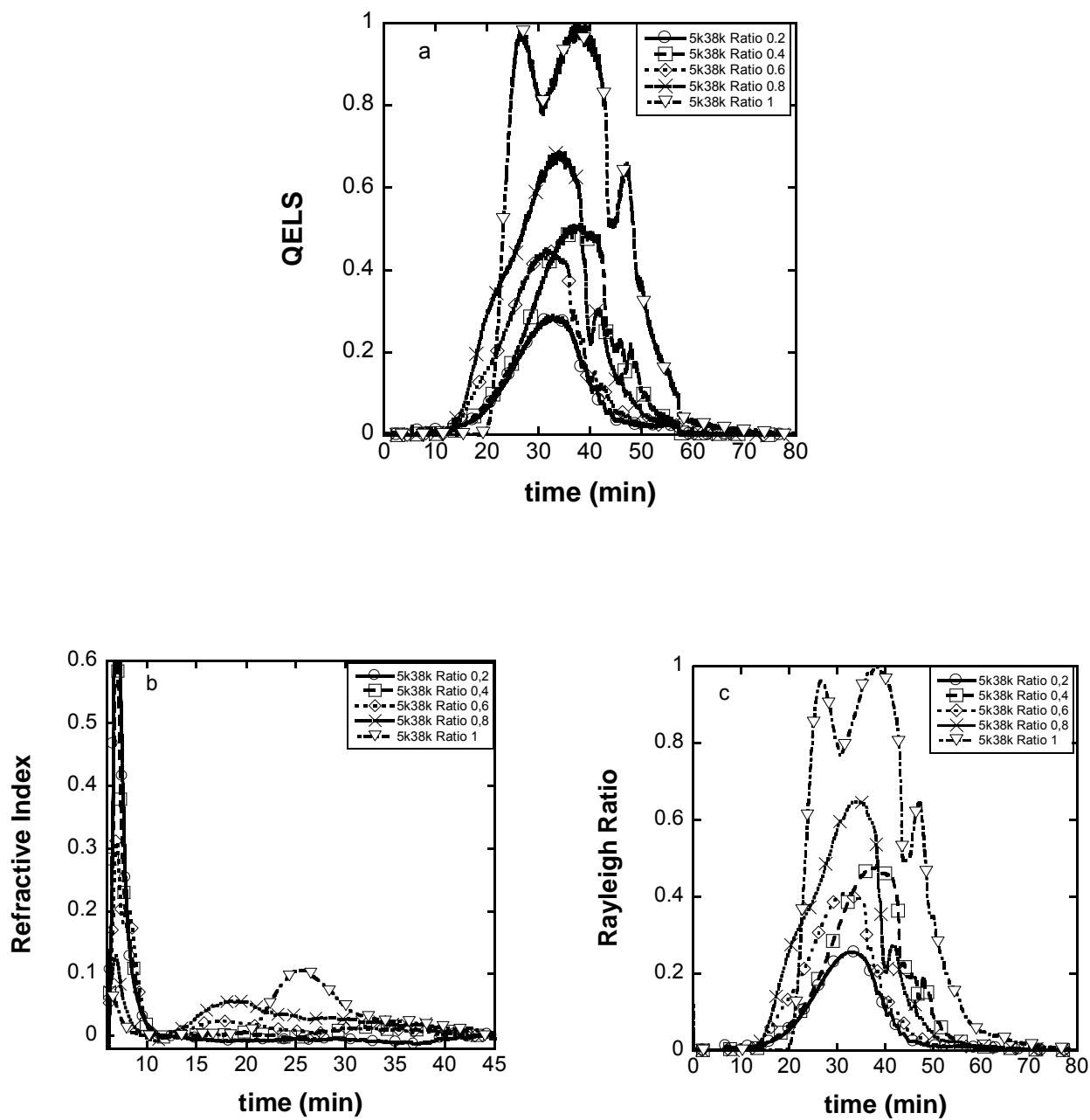


Figure V-13 : Etude de l'effet du ratio sur les PICs PEO-PAA 5-38/DGL 3
a : QELS, b : RI, c : MALS

	Rh			Rg		
Ratio	6k3k	6k12k	5k38k	6k3k	6k12k	5k38k
0,2	-	44*	50	-	41*	36
0,35		67*			25*	
0,4	-		54	-		48
0,5		25			17	
0,6	12*		30-51	26*		20-43
0,7		21-38			12-25	
0,8	18		25-45	12*		19-37
0,9		35			25	
1	27		38-53	17		27-46

Tableau V-9 : Analyse des différents Rg et Rh

** Signifie une marge d'erreur conséquente sur l'analyse*

Les Rg sont toujours calculés avec le dn/dc des objets stœchiométriques

Le pic RI se comporte exactement de la même façon que les précédents avec cependant un signal beaucoup plus important à 0.8 pour un pic allant de 12 à 30 minutes. Le pic du PIC à ratio 1 est positionné de 20 à 33 minutes sous le premier pic du MALS au même ratio.

Le MALS lui présente des pics s'étalant entre 20 et 45 minutes, avec souvent une excroissance au-delà de 40 minutes, celle-ci est générée par la diminution du flux croisé et ne peut donc pas être facilement analysée comme un épaulement ou une autre population.

Cependant, on ne peut pas observer un comportement général. Si les pics sont toujours aux mêmes positions (ie 10 à 45 minutes), sauf pour le ratio 1 qui commence à 20min et s'étend bien plus loin, ils ont des formes et des intensités très différentes.

La croissance en intensité est presque corrélable si l'on omet le ratio 0.6 qui semble être particulier. On peut observer que le pic du ratio de 0,4 semble se retrouver dans le pic du ratio 1 en ayant translaté vers les tailles plus petites entre les deux. Enfin, à 0,8, on observe comme pour le pic précédent un épaulement superposable avec le pic RI du même ratio.

Dans ce cas, les analyses DLS en batch ont montré une augmentation linéaire de l'intensité diffusée en fonction du ratio, signe d'un processus coopératif. Le fait que la taille des objets formés analysée en nombre reste stable pour des ratios supérieurs à 0.3 semble aller dans ce sens. Pour l'analyse en intensité, la taille reste stable pour des ratios supérieurs à 0.5. Ceci est à rapprocher de l'analyse des fractogrammes de MALS pour lesquels la taille n'évolue pas en fonction du ratio.

Dans l'hypothèse d'un processus coopératif, il est alors possible d'évaluer les rayons de giration des objets (Tableau V-9) et du rapport Rg/Rh, indication de la morphologie de l'autoassemblage. Les rapports obtenus oscillent entre 0.7 et 0.9, ils correspondent à des objets sphériques ayant un cœur de densité moyenne.

Il semblerait donc que les trois PICs présentent trois comportements différents :

- La formation du PEO-PAA 6-3 / DGL3 se ferait par un processus non coopératif avec un seuil à 0.8
- Celle du PEO-PAA 6-12 / DGL3 par un processus non coopératif

- Celle du PEO-PAA 5-38 / DGL3 par un processus coopératif

Il est toutefois à noter que la physico-chimie des PICs reste difficile à interpréter et que d'autres techniques mériteraient d'être utilisées pour analyser la morphologie de chaque système. C'est dans ce sens que des expériences en diffusion des rayons X ont été réalisées à l'ESRF de Grenoble et restent à interpréter.

d. Etudes FI-AsFFFF des différentes charges dans les PICs PAPTAC-PNIPAM

Pour finir et dans l'optique d'utiliser les PICs comme vecteur de photosensibilisateurs, nous avons étudié les PICs chargés avec les différentes charges proposées précédemment: la Chlorine E6 (CIE6), l'Aluminium phthalocyanine disulfonate (Alphth S2) et l'Aluminium phthalocyanine tétrasulfonate (Alphth S4)(Figure V-15). La Figure V-14 re-présente pour rappel le fractogramme FI-AsFFFF du PIC choisi, le PAPTAC-PNIPAM 1-9 / PAA 10. Les Figure V-17, Figure V-18 et Figure V-20 présentent quant à elles les fractogrammes pour chaque photosensibilisateur (le nombre de charge des photosensibilisateur réduit le nombre de PAA). Pour chaque figure, un premier fractogramme montre l'élution du photosensibilisateur seul, puis en présence de PAPTAC-PNIPAM, puis du PIC complet.

Il est à noter que les Mw ne seront pas donnés car les objets chargés sont très difficiles à caractériser en MALS et l'erreur sur cette dernière est jugée bien trop importante (dû entre autres aux problèmes de fluorescence).

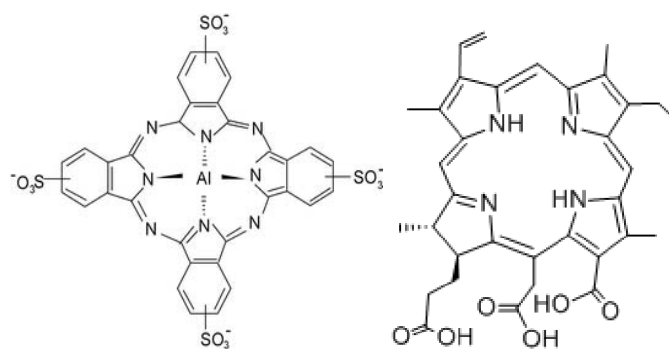


Figure V-15 : A gauche l'Aluminium phthalocyanine tétrasulfonate, à droite la Chlorine E6

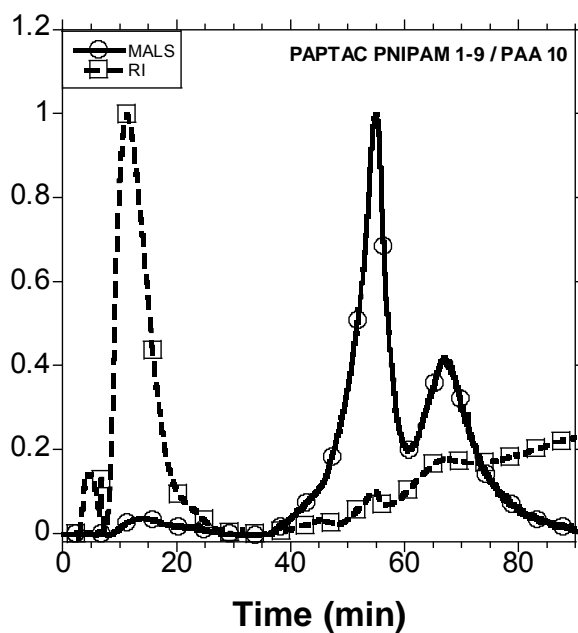
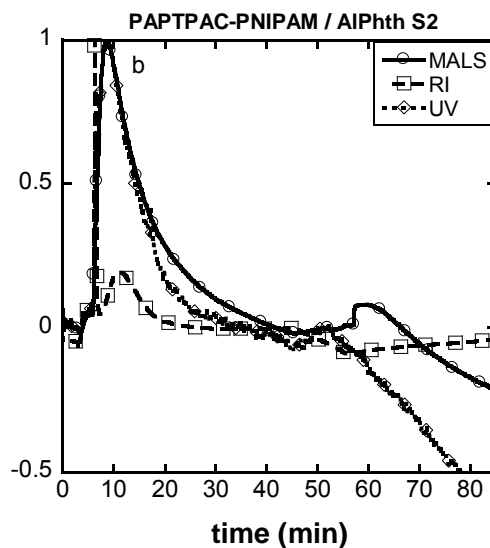
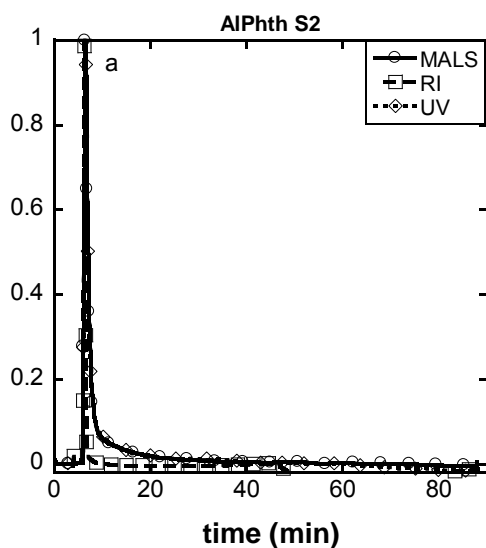


Figure V-16 : PIC PAPTAC PNIPAM 1-9 / PAA 10 seul analysé en FI-AsFIFE
 Le signal UV étant nul aux longueur d'onde observer, il n'est pas représenté



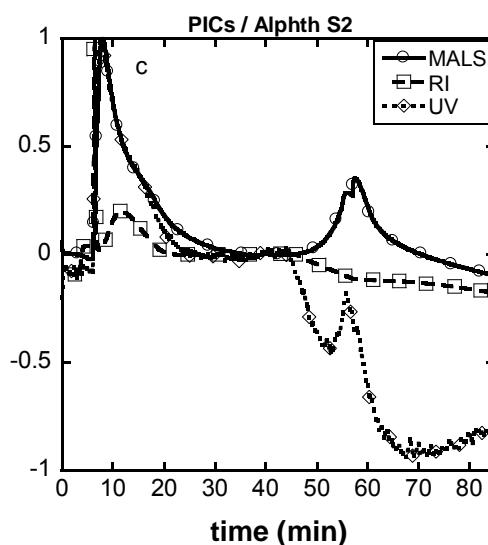
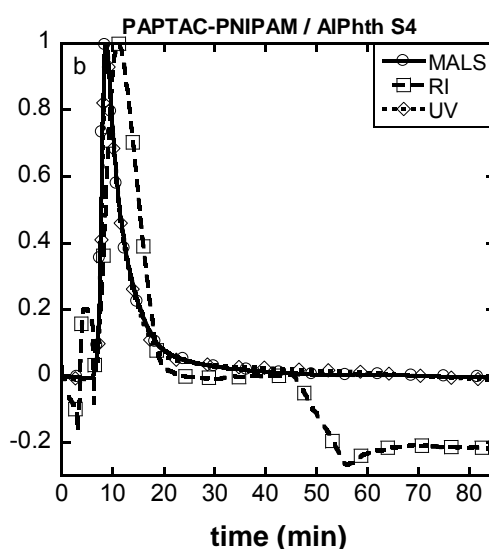
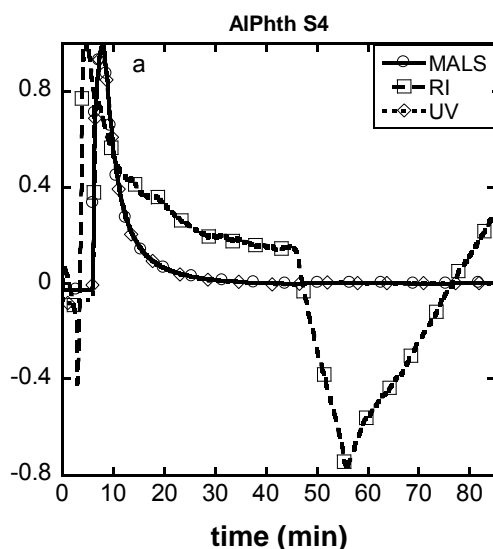


Figure V-17 : Etude de la charge de AlPhth S2a : Photosensibilisateur seul, b : PAPTAC-PNIPAM/Photosensibilisateur, c : PICs/Photosensibilisateur

Le cas des objets avec l'AlPhthS2 semble être assez facilement compréhensible. On observe un premier pic à 6 minutes juste après le début de l'élution en UV, il se retrouve partout et est donc le photo-sensibilisateur lui-même. La présence de PAPTAC-PNIPAM semble faire une association avec la charge formant un pic de 8 à 20 minutes mais ne prenant pas toute la charge (ie. un pic UV reste visible à 6 minutes), de même que le PIC complet qui se positionne au même endroit.

Nous avons donc pour le cas du PIC/AlPhth S2 une charge du PIC visible en UV mais qui ne semble pas être totale, de plus la création d'un gros objet sortant à 60 minutes et comportant de la charge semble être inhérent à l'Alphth S2.



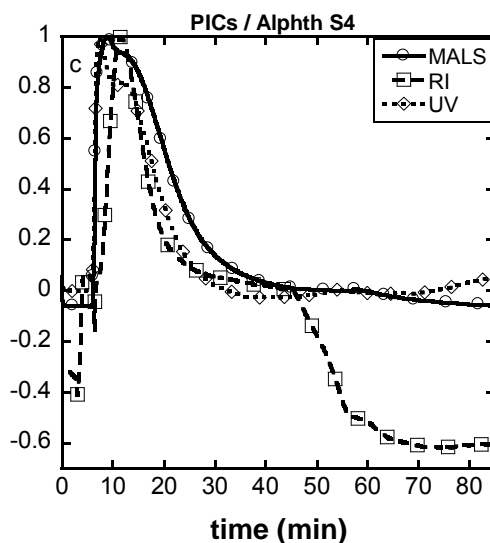
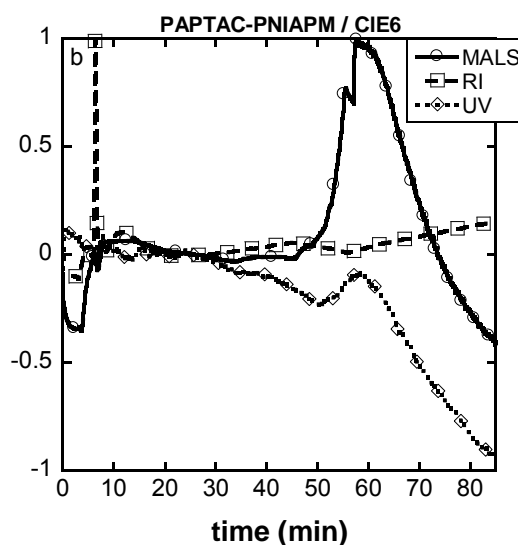
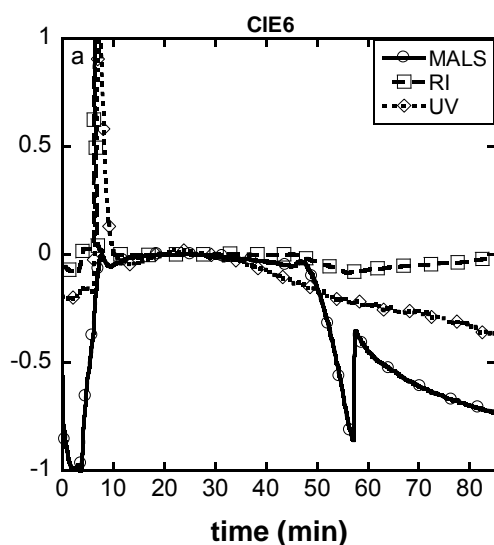


Figure V-18 : Etude de la charge de l'AlPhtht S4

a : Photosensibilisateur seul, b : PAPTAC-PNIPAM/Photosensibilisateur, c : PICs/Photosensibilisateur

Pour l'AlPhthtS4, peu de choses peuvent être dites comme le pic UV de la charge seule est positionné dans les grandes tailles et traîne longuement. Cependant, un épaulement au niveau de l'UV du PIC semble vouloir signifier qu'une partie de la charge s'est peut être liée avec le PIC. De plus amples recherches seraient nécessaires pour approfondir ces analyses. Il est tout de même intéressant d'observer que dans ce cas aucun autre objet n'est créé aux temps plus longs. La présence d'AlPhtht S4 paraît même avoir dissocié les agrégats qui étaient visibles sur le PIC seul (Figure V-19).



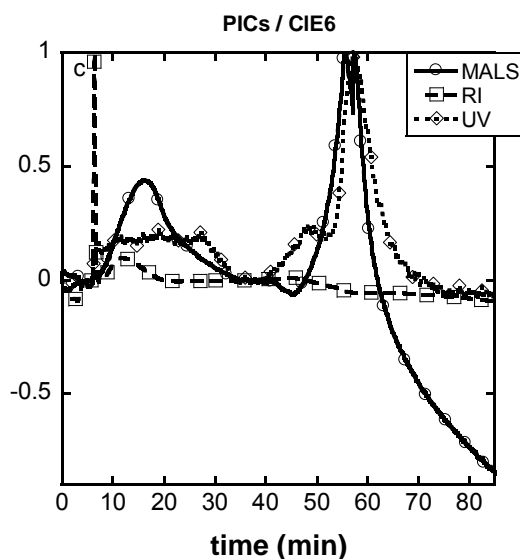


Figure V-20 : Etudes de la charge de CIE6.
a : Photosensibilisateur seul, b : PAPTAC-PNIPAM/Photosensibilisateur, c : PICs/Photosensibilisateur

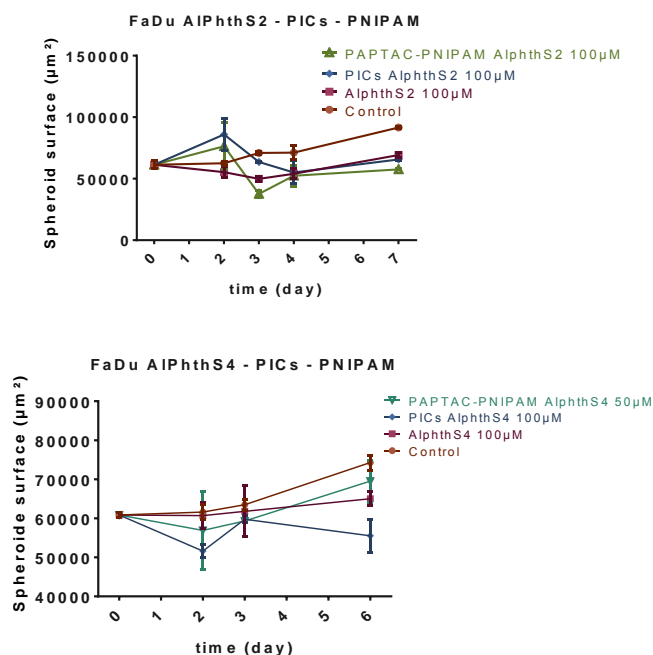
Enfin le cas de la CIE6 donne, en plus des objets que nous avons déjà observés, des PICs qui semblent être chargés étant donné que le pic UV est centré sur les temps courts pour la CIE6 libre et ici centré sur les zones avec RI. Cependant on retrouve une majorité de très gros objets déjà observés simplement avec le PAPTAC-PNIPAM 1k9k sortant à 50 minutes et plus. Ces gros objets ont été observés floculant au fond des tubes.

Il est à noter que l'AsFIFFF en passant par la méthode du Frit-inlet nous a permis une analyse de précision bien au-delà des analyses possibles avec les autres méthodes accessibles. Nous avons donc pu analyser différents objets, ainsi que des assemblages chargés et même la croissance de PICs avec le ratio ou le comportement de ces derniers en milieu salin.

5. Etude biologique

Malgré la difficulté à bien caractériser les PICs, nous avons cherché à analyser l'effet de ces objets en PDT sur les sphéroïdes, l'équipe de Kataoka ayant montré que les PICs pouvaient conduire dans certains cas à de bonnes efficacités [286]. Nous avons donc commencé par les analyses du PAPTAC-PNIPAM 1-9/PAA 10 avec la charge toujours à 1/30^{ème} malgré le fait que le PNIPAM à 37°C soit au-delà de sa LCST (lower critical solution temperature) et que les PICs ont donc tendance à floculer. L'évolution de la taille des sphéroïdes est présentée Figure V-21.

Sphéroïdes FaDu



Sphéroïdes HCT 116

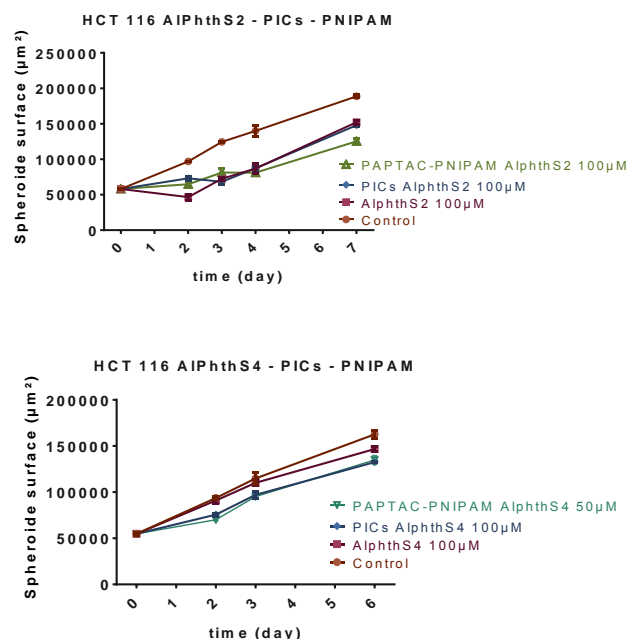


Figure V-21 : Effet des PICs PAPTAC-PNIPAM 1-9 / PAA10 chargés à 1/30 mol/mol sur des sphéroïdes après traitement en PDT

Nous pouvons observer, que, dans le cas des HCT 116, aucun effet notable supérieur à un retardement de la croissance n'est observé. Pour le cas des FaDu par contre on semble voir que le PICs chargé avec l'AlPhthS4 pourrait être intéressant car montrant une décroissance du sphéroïde, cependant aucun test statistique ne semble le trouver significativement écarté du retardement de croissance (ligne horizontale) à cause de l'incertitude sur les mesures. Cette dernière est liée au fond complexe des images observées à cause des PICs qui ont floculé.

Une petite toxicité pour les sphéroïdes (non montrée ici) a de plus été répertoriée dans le cas des objets seuls pour les FaDu mais pas pour les HCT 116 qui semblent ne pas attacher d'importance à la floculation des objets.

Nous pouvons donc en déduire que dans le cas présent des connaissances, ces PICs ne pourraient être utilisés comme vecteurs d'autant plus que la floculation de ces derniers est extrêmement dangereuse pour la circulation sanguine.

Sphéroïdes FaDu

Sphéroïdes HCT 116

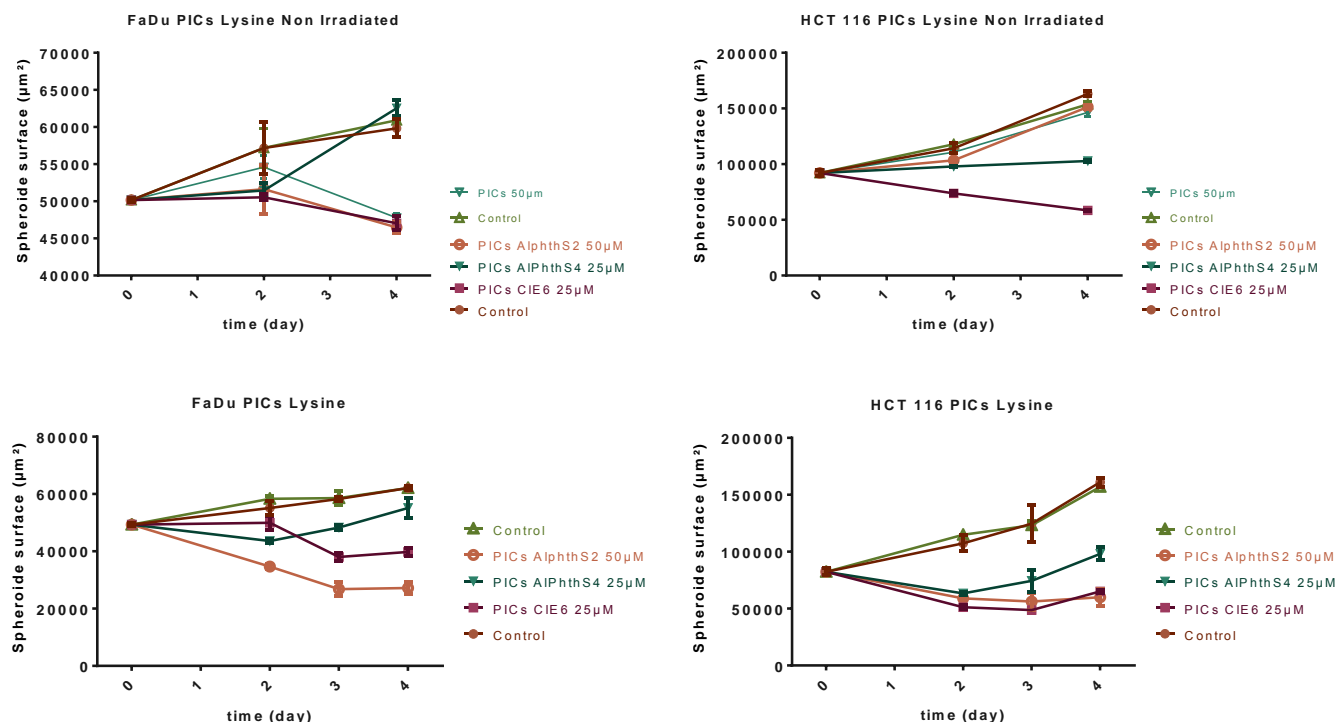


Figure V-22 : Effet des PICs lysines sur les sphéroïdes en tant que vecteur PDT

Nous avons ensuite observé les PICs Lysines (PolyLysine/PEO-PAA 5-38) en présence de sphéroïdes toujours avec le même ratio de charge à 1/30^{ème} (Figure V-22).

Il est intéressant de regarder en premier lieu les objets non illuminés pour avoir la toxicité dans le milieu. Ces objets ne sont observés que deux fois à J2 et J4 pour éviter l'excitation des molécules par l'observation au microscope et sont comme à notre habitude observés en fond noir dans le but de limiter l'irradiation parasite qui pourrait activer les photo-sensibilisateurs.

On observe donc que pour les FaDu tous les objets sont toxiques ce qui limite l'intérêt du vecteur, bien que le sphéroïde exposé au vecteur seul semble rapidement reprendre sa croissance. Dans le cadre des HCT 116, seul le PIC CIE6 est très toxique et le PIC AlPhth S4 bloque la croissance. Le PIC seul comme le PIC très chargé en AlPhth S2 semble lui ne pas avoir de souci de cytotoxicité.

Pour le cas de la photocytotoxicité, pour les HCT 116 (comme les objets sont naturellement toxiques pour les FaDu) on observe que tous les objets sont très efficaces avec une décroissance pertinente statistiquement et une recroissance plutôt bloquée sauf pour les AlPhth S4.

Le PIC PolyLysine/PEO-PAA 5-38 dans le cadre du traitement des HCT 116 semble être le seul relativement intéressant. Pour autant, le fait qu'il puisse se retrouver dans la circulation et, en entrant en contact avec d'autres cellules, exprimer une forte toxicité nous fait émettre des réserves plus que consistantes.

6. Conclusion

Les PICs sont des objets complexes autant dans leur assemblage que dans leur analyse, leur faiblesse aux flux et à toute autre force chimique ou physique en fait des objets difficiles à caractériser correctement, la DLS en batch permet d'apporter les premiers résultats, le fractionnement flux-force a permis de les compléter.

Si l'AsFIFFF montre rapidement ses limites de par la nécessité de focus et donc d'un fort taux de cisaillement pour des PICs, la FI-AsFIFFF a montré d'excellentes capacités à analyser les objets de PICs qui ne peuvent être analysés autrement et a donné des pistes sur de nombreux points.

Cependant il est à noter que les PICs ne semblent pas pour le moment être des objets très intéressants pour la biologie, leur instabilité aux sels et donc au milieu ainsi que leur forte toxicité sans lumière ou leur efficacité moindre n'en faisant pas, pour l'instant et dans la limite de nos connaissances, des vecteurs d'envergure.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Si aucune tendance générale qui lierait une efficacité thérapeutique aux analyses obtenues par les diverses méthodes ne peut être donnée/livrée en tant que clef magique de la formation des vecteurs à notre niveau, plusieurs points émergent de cette thèse. Certains de ceux-ci ont une forte importance pour le domaine de la vectorisation.

Un point crucial mis en exergue dans ce travail porte sur la partie biologique de la recherche dans le domaine des nano-vecteurs. Cette dernière est parfois utilisée comme une boîte noire qui donne des résultats rapides mais dont une bonne compréhension est nécessaire, au minimum concernant les modèles appliqués. Nous avons montré que le modèle de la culture cellulaire en 2D est très loin de l'application que nous voulons donner aux vecteurs, il n'est donc pas étonnant que cette approche donne des résultats erronés et ce, même en comparant différents vecteurs entre eux sur une même lignée cellulaire. Le modèle sphéroïde, au contraire, permet notamment la prise en compte de la diffusion et donc apporte des résultats plus complets sans pour autant requérir une charge de travail insurmontable. Pour montrer cela, la caractérisation d'objets réticulés à différents degrés a permis de mettre en évidence que pour un modèle en 2 dimensions l'efficacité en PDT a tendance à diminuer avec le degré de réticulation et que cet effet s'inverse pour une culture/modèle en 3 dimensions avec l'ajout de la diffusion et des interactions cellule-cellule. Qu'il s'agisse des résultats de microscopie de fluorescence, ou des effets en PDT, tout semble montrer que les objets réticulés pénètrent mieux dans la masse tumorale. Et, si le relargage est possiblement plus lent, ce qui n'a pas été prouvé ici, les objets réticulés n'en sont pas moins plus efficaces. Or le modèle en deux dimensions ne prend pas en compte la diffusion du médicament ou du vecteur dans les tumeurs. Cette diffusion est pourtant cruciale dans le cadre de la vectorisation pour permettre la destruction de la tumeur dans son intégrité. De plus, le modèle sphéroïde répond en grande partie aux demandes de multiples ONG de réduire voire de cesser toute expérimentation animale. Il fournit un modèle stable dont les expériences ne représentent pas de difficulté particulière si ce n'est d'acquérir le savoir-faire nécessaire et qui peut permettre un certain taux de screening comme pour ce travail.

Le second point ayant une grande importance pour la communauté de la vectorisation est l'étude des multiples populations d'objets, que ce soit au niveau de la caractérisation physico-chimique ou biologique de ces derniers. Dans le premier cas, il est connu dans le monde de l'analyse que la DLS n'est viable pour la caractérisation de ces objets multi-population qu'après une séparation, et que la TEM a parfois tendance à faire changer la morphologie des objets à cause du séchage. Cependant, certaines études restent basées uniquement sur la DLS voire la TEM pour attester du caractère monomodal d'un objet. Il a été montré dans ce travail que ceci est dangereux à cause des limitations de la DLS et de sa sensibilité aux gros objets. Cependant nous avons aussi montré que les objets comportant des multi-populations possèdent des effets synergiques ou antagonistes entre lesdites populations pour l'efficacité thérapeutique en PDT. Ces effets différents en fonction des lignées cellulaires et des objets étudiés, ouvrent une possible voie d'étude et d'amélioration des vecteurs et de leur design.

Il a aussi été montré qu'il était possible d'analyser de multiples objets par des techniques de FFF et plus particulièrement par AsFIFFF. Ces diverses analyses ont prouvé l'efficacité d'une telle méthode pour les auto-assemblages sans pour autant aller jusqu'aux limites de l'appareil. Ainsi, grâce à la technique de FI-AsFIFFF, il nous a même été possible d'analyser des objets particulièrement sensibles comme les PICs. Nous avons été capables de différencier les objets comportant des

populations multiples. Ainsi leur comportement au cours de la formation ou encore en présence de sel a pu être caractérisé. La méthode d'analyse robuste qu'est la FFF a donc été utilisée sur tous les objets que nous avons étudiés, permettant d'accéder grâce un couplage UV-RI-MALS à de nombreuses informations morphologiques sur les objets analysés.

D'une façon globale, nous avons caractérisé une large gamme de micelles et de polymersomes différents sans jamais véritablement voir un effet de taille car des micelles réticulées peuvent être aussi efficaces que des polymersomes allongés ou sphériques de taille dix fois supérieure. L'efficacité des assemblages réticulés sur les sphéroïdes est quant à elle un autre résultat marquant de ce travail ouvrant là encore d'autres possibilités pour la vectorisation.

Si malheureusement, nous n'avons pas sorti de clef parfaite de la construction d'objet pour la vectorisation nous pouvons aussi dire que les paramètres importants de ces vecteurs dépendent de la lignée cellulaire visée et ne peuvent donc pas être extraits indépendamment de façon générale.

Nous ouvrons donc ce travail sur de nombreuses questions, quels sont les effets de la PDT dans les cellules ? Comment les vecteurs entrent-ils ? D'où vient la différence que nous avons observée entre les vecteurs sur les cellules comme sur les GUVs [Annexe p 166] ? Et si ces questions font d'ores et déjà l'objet d'une nouvelle thèse entre l'IMRCP, l'IPBS et l'Université de Florence, il en reste de nombreuses autres.

Pourquoi les objets réticulés ont-ils cette efficacité supérieure ? Comment peut-on expliquer les effets de synergie ? Comment se comportent tous ces objets en présence de milieu de culture ? ...

Ainsi si de nombreux points ont pu être abordés et éclaircis, des perspectives de recherche ont été ouvertes.

Annexes

Perspectives et ouverture sur une autre thèse

a. Présentation

Dans le but de comprendre l'interaction entre le Phéo et les cellules, des expériences ont été réalisées sur des GUV (Giant Unilamellar Vesicles) au cours d'un séjour à l'Université de Florence à partir de DOPC (Figure 0-1) par électro-formation.

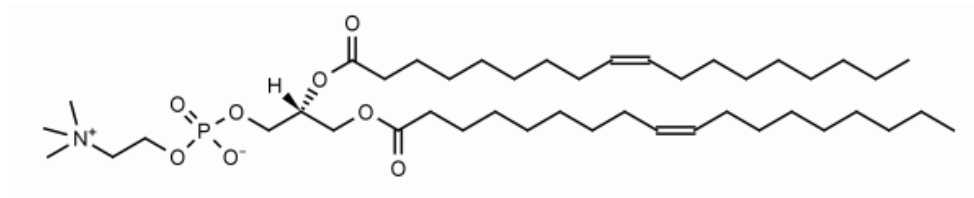


Figure 0-1 : 1,3-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC)

Les vésicules ainsi formées sont ensuite mises dans des puits puis observées. Il leur est rajouté, comme indiqué dans la Figure 0-2 le vecteur chargé en objet photoactif. A partir de ce moment, les vésicules sont recherchées avec le moins d'illumination possible puis des clichés sont pris au microscope confocal.

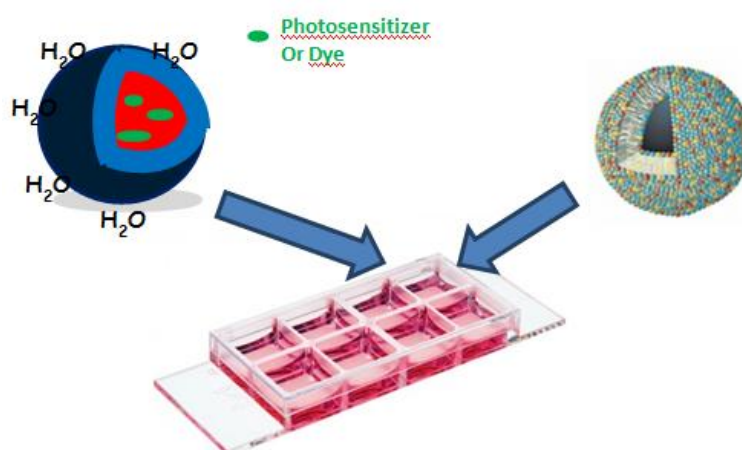


Figure 0-2 : Dispositif utilisé pour les expériences à Florence

b. Interactions avec les GUV et effet d'une illumination

Dans le but d'observer l'action du Phéo, le laser est augmenté pendant l'observation d'une GUV et sa réaction est filmée par le microscope. C'est donc parmi ces réactions que nous avons trouvé celle que nous allons rapidement évoquer et montrer en figure Figure 0-3 : une explosion.

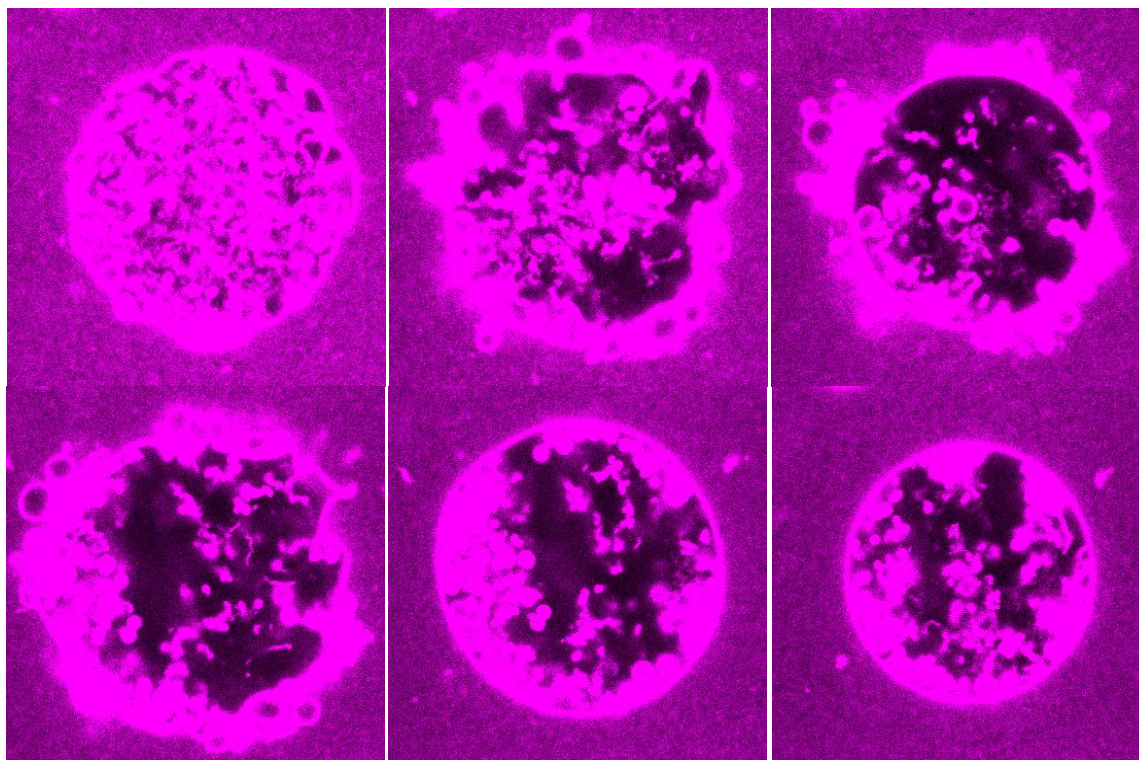


Figure 0-3 : Cas d'une explosion générée par illumination de la vésicule chargée en Phéo

Nous savions, pour avoir traité les cellules et les avoir observées au microscope confocal, que le phéophorbide avait tendance à être excité en présence d'un laser. Cependant, dans les cellules, des phénomènes bien plus complexes se passant, il était très compliqué d'avoir une idée de ce qui tuait les cellules que nous observions.

Dans ce cas là, c'est une des réponses qui a été observée, mais bien d'autres ont été observées dans la littérature, des déformations entre autres mais jamais avec un photosensibilisateur vectorisé.

Mais cette explosion est, à nos yeux, très particulière car elle a lieu en une suite de mouvements, dont le premier est l'éjection de petites vésicules de la grosse, suivi par une réabsorption de celles-ci. Nous avons donc un aller retour des petites vésicules qu'il est complexe d'expliquer.

Pour ce qui est des déformations, elles sont expliquées par le choc d'oxydation généré par le Phéo au moment de son activation et la génération de molécules d'oxygène singulet (et d'oxygène singulet uniquement). Ainsi la double liaison du DOPC est attaquée et les GUVs subissant une transformation chimique connue pour changer la rigidité membranaire, oscillent. L'expulsion et la réabsorption sont sans doute eux aussi à lier à des changements de pression osmotique liés à ces mêmes radicaux actifs. Il est aussi intéressant de savoir que tous les objets ont aussi été testés chargés avec une autre sonde (ici le DIO) et que les GUVs n'avaient aucunement changé, et aucune explosion ou déformation de celle-ci n'était alors visible quel que soit le vecteur.

c. Effet du vecteur

Cette expérience a eu le mérite de montrer un point très important pour cette thèse, la différence notable d'interaction qu'il y a entre les cellules, ici modélisées simplement par des GUVs, et les différents vecteurs.

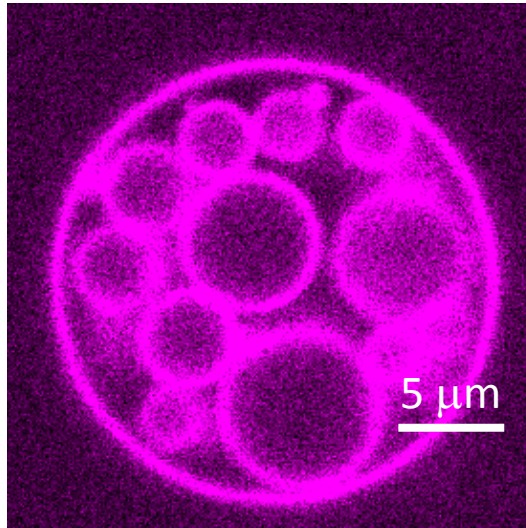


Figure 0-4 : Cas du vecteur PEO-PCL 5000-4000

Dans le cas du PEO-PCL 5000-4000 (Figure 0-4) on peut observer dans le milieu des GUV plutôt de petite taille et remplis d'autres GUVs, des filaments et surtout des objets qui explosent (se vidant des GUV internes) et se reformant comme nous l'avons déjà abordé.

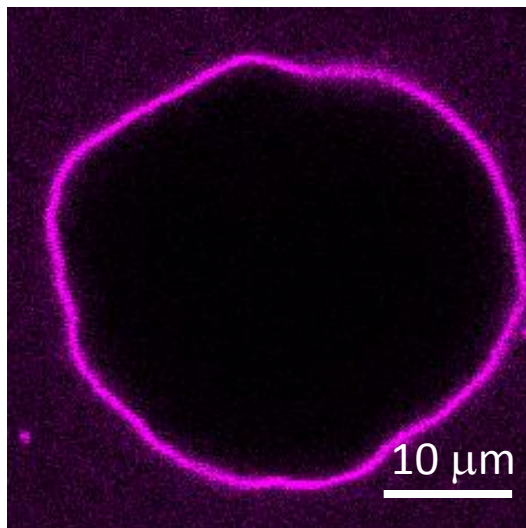


Figure 0-5 : Cas du vecteur PEO-PCL 5000-4000 réticulé

Mais dans le cas du même polymère cette fois-ci réticulé (Figure 0-5) le comportement change du tout au tout. Les GUVs, bien que très chargés en surface ne sont pas remplis d'autres GUVs et semblent bien moins sujets à explosion. De plus elles n'ont pas beaucoup diminué de taille par rapport à leur état avant ajout du vecteur.

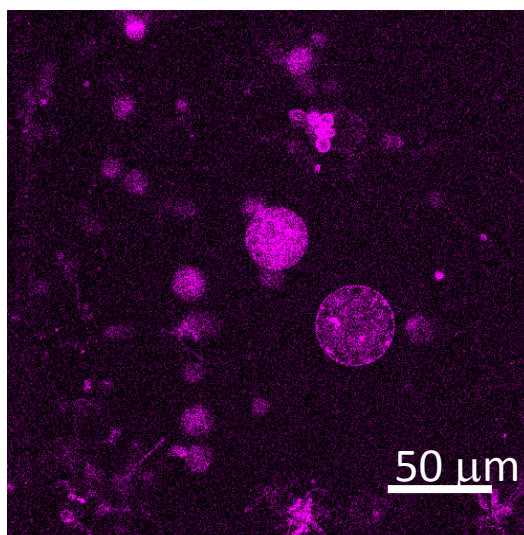


Figure 0-6 : Cas du vecteur PEO-PLA 2400-2000

Dans le cas de l'ajout de PEO-PLA 2400-2000 (Figure 0-6), on voit de nombreuses petites GUVs et beaucoup de filaments comme si un grand changement avait eu lieu en quelques secondes avant l'observation.

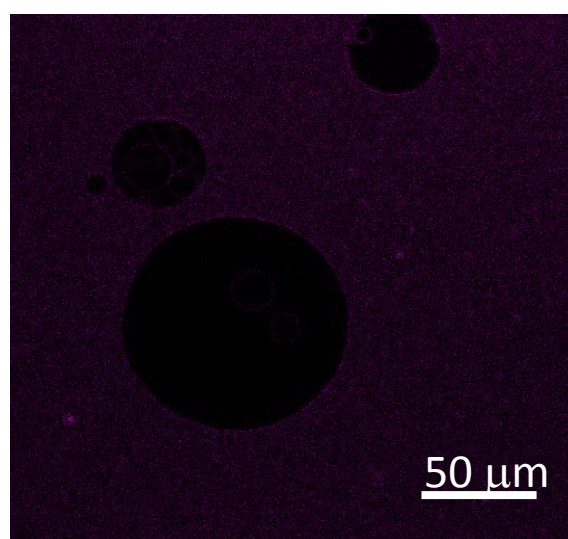


Figure 0-7 : Cas du vecteur PEO-PS 3100-2300

Le PEO-PS 3100-2300 (Figure 0-7) quant à lui échange très peu de Phéophorbide avec les objets qui restent tels qu'ils étaient et rien ne se passe. Il est même très difficile de discerner la membrane des GUVs qui d'habitude sont chargés en Phéophorbide.

Ceci correspond bien à ce qui a été observé jusqu'à maintenant et cette difficulté à abandonner le phéo pour les micelles de PEO-PS qui fait aussi leur force dans le cadre des sphéroïdes.

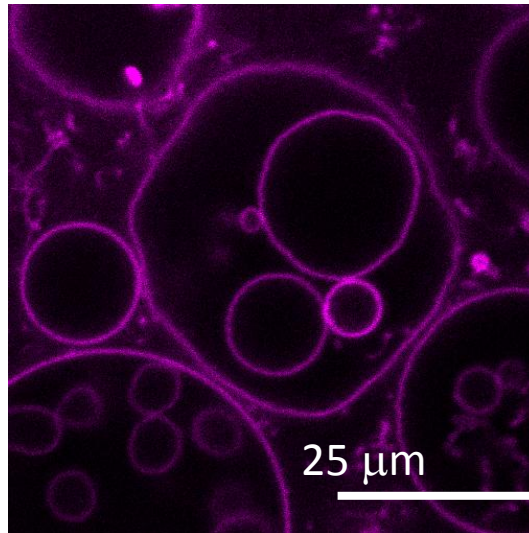


Figure 0-8 : Cas du PEO-PCL 5000-11000

Enfin les polymèresomes PEO-PCL 5000-11000 ont une situation intermédiaire (Figure 0-8) avec des GUV toujours très grandes, quelques filaments visibles, et des GUVs à l'intérieur de GUVs, il a aussi été possible de voir des explosions et des déformations avec ce système là.

d. Conclusion

Ces expériences, en travaillant sur des GUVs, nous ont permis d'approcher les problématiques en lien avec les interactions photosensibilisateur/membrane des cellules et, d'une façon pratique, de prendre conscience de la violence du processus de PDT. Des comportements nettement différents selon les vecteurs ont été observés et une nouvelle thèse va commencer pour approfondir cette approche. L'objectif sera de répondre aux questions suivantes :

- Peut-on établir une sorte de cartographie des comportements explosifs visualisés en fonction des nanovecteurs utilisés et du photosensibilisateur ?
- Quelle est l'influence de la composition du GUV (présence éventuelle de cholestérol, de phospholipide saturé...) ?
- Que se passerait-il en cas de vecteur mixte polymère/lipide ?
- Est-il possible d'établir un parallèle entre la cartographie de comportements obtenus et une efficacité thérapeutique de PDT ?

Matériels et méthodes :

Produits chimiques

Tous les copolymères ont été achetés auprès de Polymer Source Inc. (Dorval Montréal, Canada), le Phéo chez Wako (Osaka, Japon). Les Poly (acide acrylique) (PAA) et la poly (lysine) Plys ($15000-3000 \text{ g.mol}^{-1}$) ont été achetés chez Aldrich, la polylysine dendrigraft (DGL) a été donnée par Colcom (Montpellier, France). Le poly [(3-acrylamidopropyl) triméthylammonium - b - N - isopropyl acrylamide] a été aimablement fourni par M. Destarac, il a été synthétisé par polymérisation RAFT.

Le PrestoBlue et le milieu de culture cellulaire ont été achetés chez Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France). La Pénicilline-streptomycine, le sérum de veau fœtal (FBS), le PBS, et le chlorure d'acryloyle étaient de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le Celltiter-Glo 3D test de viabilité cellulaire a été acheté chez Promega (Madison, WI, USA).

Fonctionnalisation acrylate

Dans un ballon propre et sec, 500 mg de polymère séché sont dissous dans 8 mL de dichlorométhane anhydre (séché sur alumine). 100 équivalents de chlorure d'acryloyle et 10 équivalents de triéthylamine sont ajoutés dans 7 mL de dichlorométhane anhydre. Le mélange est ensuite additionné lentement à 0 °C sous atmosphère d'argon. La réaction est agitée dans la glace pendant 4 h puis à température ambiante pendant 48 h.

La purification a été effectuée par une cryo-distillation après addition de 3 mL d'acétate d'éthyle. La solution a ensuite été centrifugée dans une centrifugeuse Hettich universel 32R à 10 °C (4 000 tours par minute pendant 10 minutes). Le surnageant a été recueilli et le solvant a été évaporé pour obtenir le polymère. Le polymère a ensuite été dissous dans 1 mL de dichlorométhane et placé dans 20 mL d'éthanol absolu. Le dichlorométhane a été éliminé à 30 °C, 150 mbar, pendant 30 minutes et la solution a été placée à -20 °C pendant 48 h. Après centrifugation à -10 °C (8 000 tours par minute pendant 10 minutes), le culot a été prélevé et séché.

Les taux de fonctionnalisation des différents polymères ont été obtenus en fonction du polymère et un rendement moyen de $64 \pm 7\%$ a été atteint.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, 128 cycles avec des temps de relaxation 10s, ppm): 6,33 (acrylate, dd); 6,12 (acrylate, dd); 5,83 (acrylate, dd); 4,02 ($\text{CH}_2\text{-OCO}$, PCL); 3,61 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$, PEO); 3,34 (MeO, s); 2,27 ($-\text{CH}_2\text{-CO-}$, PCL); 1,61 ($-\text{CH}_2\text{-}$, PCL); 1,37 ($-\text{CH}_2\text{-}$, PCL).

Préparation de micelles polymères par addition de solvant

Pour les polymères PEO-PCL 2000-2800, PEO-PCL 5000-4000, PEO-PS 3100-2300, PEO-PLA 2000-2400,

0,4 mL d'une solution de polymère dans l'acétone (50 mg.mL^{-1}) est ajouté goutte à goutte dans 5 mL d'eau milliQ (résistivité $18 \text{ M}\Omega\text{.cm}$, filtrée sur un filtre de $0,2 \mu\text{m}$) sous agitation (concentration finale de 4 mg.mL^{-1}). La solution a été laissée au repos pendant deux jours pour éliminer l'acétone.

Préparation d'auto-assemblages polymères par réhydratation de film

Pour les polymères PEO-PCL 2000-7000, PEO-PCL 2000-4800, PEO-PCL 5000-11000

20mg solution de polymère sont dissous dans 1mL de chloroforme puis le solvant est évaporé sur un évaporateur rotatif pour former un film régulier qui a ensuite été séché sous vide pendant 4 heures. Celui-ci est ensuite réhydraté avec 2 mL d'eau milliQ (résistivité 18 mS.cm, filtrée sur un filtre de 0,2 µm), la solution est chauffée à 65 ° C pendant 30 min et 1 h à 65 ° C sous ultra-sons. La solution est ensuite extrudée sur un système de mini-extrusion d'Avanti Polar Lipids avec une membrane en polycarbonate avec un seuil de coupure à 0,4 µm.

Réticulations

Celles-ci ont été réalisées soit avec du persulfate de sodium à 0,3 mol% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, dans l'eau), du persulfate de sodium et le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dans l'eau), l'azobis-isobutyronitrile (AIBN, une solution dans l'acétone), ou aucun amorceur autre que la lumière.

Le rapport entre les amorceurs et les fonctions acrylate a été maintenue à 3% en mole. Pour les systèmes polymérisés en bout de chaîne, la solution d'amorceur a été ajoutée à une solution de vecteur faite à partir de polymère préalablement fonctionnalisé acrylate (4 mg.mL⁻¹) et dégazée sous argon. Celle-ci a été mise à 50 ° C pendant 24 à 72 heures.

Pour la réticulation (Cross-linked), la solution contient en outre 15 µL d'éthylèneglycoldiméthacrylate (EGDMA) (dilué à 1 mol% dans l'acétone). Au cours de la réaction, une seconde portion de 15 µL d'EGDMA a été ajoutée après 24 h. Les essais de réticulation ont été entièrement réalisés en triplicats.

Le pourcentage de réticulation a été obtenu par RMN ¹H après lyophilisation pour éliminer l'eau et remise en suspension dans du CDCl_3 .

Chargement des micelles avec Phéo

Pour les micelles non réticulées, le Phéo est ajouté à la solution d'acétone lors de la préparation des auto-assemblés.

Pour tous les auto-assemblages réticulés et PEO-PCL 2000-7000, PEO-PCL 5000-11000 et PEO-PCL 2000-4800, une solution à 0,5 mg.mL⁻¹ de Phéo dans de l'acétone a été utilisée et le volume adéquat (80-160 µL en fonction du système) a été ajouté à la phase aqueuse la solution (2 à 5 mL en fonction du système) d'objet. La solution a été laissée au repos pendant deux jours pour éliminer l'acétone.

Le rapport choisi de Phéo/polymère 1/30 mol/mol nous a permis d'obtenir une encapsulation complète du Phéo, comme indiqué dans les études antérieures [].

Expériences de dialyse

Des solutions de Phéo/auto-assemblage chargé ont été diluées afin d'obtenir une concentration en Phéo à 10^{-6} M. 2 mL de ces solutions diluées ont été introduites dans un kit de dialyse (GE Healthcare Bio-Sciences, membrane MWCO à 8kDa) et dialysée contre 800 mL d'eau à 37 ° C.

La libération de Phéo a été suivie par la mesure de la densité optique de la solution interne à 688 (Phéo libre) et 669 nm (Phéo encapsulé).

Formation des PICs

Les PICs PEO-PAA / DGL3 ont été préparés en mélangeant DGL3 (0,5% en masse) de solution mère à pH 7 avec des quantités suffisantes de PEO-PAA (généralement autour de 1 mg.mL^{-1}) de solution mère à pH 7 afin d'avoir la même concentration d'acides carboxyliques et des groupes amines. La solution était ensuite complétée avec de l'eau afin d'obtenir DGL3 à une concentration finale de 0,1% en masse.

D'une manière similaire, la solution de PEO-PAA/Poly-Lys a été obtenue par addition de 85 μL de PEO5-PAA32 dans un tampon phosphate pH 7,4 (2 mg.mL^{-1}) à pH 7,4 3 mL LysHBr dans un tampon phosphate ($0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Les PICs PAPTAC-PNIPAM et PAA (pH ajusté à 5,5 en ajoutant une solution de NaOH) ont été dissous séparément dans de l'eau, ils donnent des solutions limpides et incolores. Ils ont été préparés en mélangeant des quantités appropriées de chaque polymère, à un rapport stoechiométrique souhaité, et de l'eau pour obtenir la bonne concentration. Tout d'abord un volume de solution PAPTAC-PNIPAM et de l'eau ont été mélangés, puis la quantité appropriée de solution PAA a été ajoutée.

Les PICs PEO-PAA / DGL3 à différentes concentrations de NaCl ont été obtenues en mélangeant, dans l'ordre, la solution mère DGL3 (0,5% en poids) à pH 6,7, l'eau, la solution PEO-PAA stock (0,5% en masse) à pH 7 et NaCl en solution (6M). La solution mère de PEO-PAA a été ajoutée afin d'avoir un rapport 1 entre les amines et les acides carboxyliques. Des quantités suffisantes de solution mère de NaCl ont été ajoutées afin d'avoir une concentration finale en sel de 0,2 M, 0,8 M, 1 M et 2 M. L'eau pure a été ajoutée afin d'obtenir une concentration en DGL3 finale de 0,1% en masse.

Suivi de Dialyse PICs en solutions salines

Des solutions de PEO-PAA 6-3/DGL3 à 0,2 et 2,0 M de NaCl ont été formées en mélangeant des volumes appropriés de solutions de polymères dans l'eau avec une solution concentrée de NaCl 4M. 3 mL de ces solutions ont été introduits dans des flacons de dialyse (GE Healthcare Bio -Sciences membranes avec un MWCO de 1000 g.mol^{-1}) et dialysés contre 800 mL d'eau milliQ. Le processus de dialyse a été interrompu à des moments précis afin d'effectuer des analyses de DLS.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS a été réalisée à 25 ° C sur un Zetasizer NanoZS Malvern (Orsay, France). Les solutions ont été analysées en triple exemplaire, sans être filtrées, afin de caractériser les échantillons complets. Les données ont été analysées par la méthode à usage général des moindres carrés non négatifs (NNLS) pour obtenir la distribution d'intensité pondérée par des coefficients de diffusion (D) des solutés. La précision typique de ces mesures est de 10 à 20% pour les systèmes présentant un indice de polydispersité inférieur à 0,4. Cette distribution d'intensité pondérée peut être convertie, en utilisant la théorie de Mie, à une distribution de nombres pondérés décrivant la proportion relative de plusieurs composants dans l'échantillon en fonction de leur nombre, plutôt que sur la base de leur diffusion.

La distribution d'intensité est naturellement pondérée en fonction de l'intensité de diffusion de chaque fraction de particules ou d'une famille. En tant que tel, la distribution d'intensité peut être trompeuse, étant donné qu'une petite quantité d'aggrégation ou d'une espèce de particules plus grandes peuvent dominer la distribution. Le logiciel Malvern considère la théorie de diffusion de Mie pour des objets remplis sphériques.

Microscopie électronique à transmission (TEM)

Les analyses TEM ont été réalisées avec un microscope HT7700 Hitachi (Hitachi High Tech, Hitachinaka, Japon) (tension d'accélération de 75 kV). De petites quantités de suspensions de particules dans l'eau ont été déposées sur une grille en cuivre déchargée revêtue d'une membrane de carbone, laissées de 1 à 3 min en fonction de la solution. La grille a été ensuite séchée avec du papier absorbant. Une goutte de solution d'acétate d'uranyle a été déposée sur la grille pendant 10 secondes, et la grille a été séchée sous une lampe pendant au moins 5 min.

Lorsque les images contiennent un grand nombre d'objets distincts (typiquement > 200), une mesure de la taille moyenne (ainsi que l'écart-type) a été réalisée avec le logiciel Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Fractionnement Flux Force (FFF)

Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AsFFFF)

L'instrument AsFFFF était un système Eclipse 3 (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne). Le canal AsFFFF a une géométrie en forme de trapèze avec une longueur de 17,3 cm, une largeur initiale de 1,1 cm et d'une largeur finale de 0,27 cm. Un espaceur Mylar de 250 µm ou 350 µm d'entretoise est placé entre la membrane d'ultrafiltration et la plaque de verre supérieure. Le mur d'accumulation est une membrane d'ultrafiltration de cellulose régénérée avec 1 ou 10 kDa cut-off (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne). Une pompe Agilent série 1100 isocratique (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) avec un dégazeur en ligne et un Agilent 1100 Autosampler délivre le flux d'éluant et l'injection de l'échantillon dans le canal AsFFFF.

De l'eau miliQ avec de l'azote de sodium à 0,02% filtrée (système de filtration sous vide en utilisant des filtres Gelman de 0,2 µm) avant utilisation a été utilisée comme éluant. Un filtre en ligne 0,1 µm (VVLP, Millipore, Allemagne) a été installé entre la pompe et le canal AsFFFF.

Les produits ont été détectés avec un détecteur à diffusion de la lumière 18 angles (MALS) DAWN Heleos II (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US) équipé d'un QELS (DLS) à 99°, un réfractomètre OptilabRex (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US), et un détecteur UV-visible Agilent 1100 ($\lambda = 412 \text{ nm}$). Les détecteurs du MALS ont été normalisés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA). L'étalonnage de l'intensité de diffusion a été réalisé avec du toluène.

Méthode : micelles de 5 à 30nm

Pour la séparation, le débit de canal Vout a été fixé à $0,3 \text{ mL.min}^{-1}$. En mode focus, le débit a été stabilisé 1 min avant l'injection à $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$. $20 \mu\text{L}$ de la solution d'échantillon ont été injectés dans le canal AsFIFFF à un débit de $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant 6 min. Après l'injection, une minute de focus a été maintenue avant le début de l'élution.

En mode d'élution, le débit du flux croisé a été fixé à $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant 20 min. le flux croisé a ensuite été arrêté afin d'éliminer toutes les particules présentes dans le système AsFIFFF.

Méthode : Polymersomes allongés type PEO-PCL 2000-7000

Pour la caractérisation de PEO-PCL 2000-7000, la modification suivante a été utilisée.

En mode d'élution, le débit du flux croisé est passé de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ à $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ en 10 min, et ensuite fixé à $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant 30 min. Le flux croisé a ensuite été arrêté afin d'éliminer toutes les particules présentes dans le système AsFIFFF.

Méthode : Mélange de micelles et de polymersomes PEO-PCL 5000-11000

Au cours du focus, le flux croisé a été fixé à $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ pour l'étude de mélange et d'échange. Après 1 minute, 10 à $60 \mu\text{L}$ de l'échantillon ont été injectés à $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant deux minutes. Après l'injection, une minute de focus a été maintenue avant le début de l'élution.

En mode d'élution pour l'échange et l'étude des mélanges le flux croisé a été fixé à $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant 10 min puis changé pour $0,15 \text{ mL.min}^{-1}$ en 5 minutes, et fixé à $0,15 \text{ mL.min}^{-1}$ pendant 25 minutes.

Méthode : Polymersomes complexes PEO-PCL 2000-4800

Pour le PEO-PCL 2000-4800, afin d'observer les 3 populations, le flux croisé a été mis à $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Le flux croisé est ensuite diminué de façon linéaire pendant 10 minutes, l'élution suivante est à un flux de $0,15 \text{ mL.min}^{-1}$ et pendant 15 min. Le flux croisé a ensuite été arrêté afin d'éliminer toutes les particules présentes dans le système AsFIFFF.

Frit Inlet Symmetrical FFIF (FI-FIFF)

Un canal Frit-inlet Frit-outlet Symétrique alimenté en éluant par trois pompes (Waters 510 HPLC, Waters 590HPLC et Waters HPLC) a été utilisé. Le mur d'accumulation était une membrane d'ultrafiltration de cellulose régénérée avec 1 kDa de cut-off (post NOVA, Allemagne). L'injection de l'échantillon a été déclenchée manuellement à l'aide d'une vanne 7 voies dans le canal entrée du SyFIFFF. Un régulateur de pression (sur mesure) a été installé après les détecteurs. Les produits ont été détectés avec un réfractomètre 410 (Waters US) et un détecteur UV (Waters 486 Tunable Absorbance Detector (401nm)).

De l'eau miliQ avec de l'azoture de sodium à 0,02% filtrée avant utilisation (système de filtration sous vide avec des filtres Gelman de 0,1 μm) a été utilisée comme éluant. Le type d'espaceur était un 250S. Le programme d'élution utilisé pour le flux croisé était le suivant: 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant tous les essais, Vinj et Vf soumis à une variation de 0,4 à 1,2 et de 0 à 8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivement.

Frit-Inlet (FI) AsFIFFF

Un canal Frit Inlet AsFIFFF a été fourni en éluant par l'Eclipse 3 (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne). Le mur d'accumulation était une membrane d'ultrafiltration de cellulose régénérée avec 1 kDa de cut-off (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne). Un espaceur Mylar 250 μm ou 350 μm d'épaisseur est placé entre la membrane d'ultrafiltration et la plaque de verre supérieure. Une pompe Agilent série 1100 isocratique (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) avec un dégazeur en ligne et un passeur d'échantillons Agilent 1100 assurent le flux d'éluant et l'injection d'échantillon dans le canal AsFIFFF.

De l'eau miliQ avec de l'azoture de sodium à 0,02% filtrée (système de filtration sous vide en utilisant des filtres Gelman de 0,2 μm) avant utilisation a été utilisée comme éluant. Un filtre en ligne 0,1 μm (VVLP, Millipore, Allemagne) a été installé entre la pompe et le canal AsFIFFF.

Les produits ont été détectés avec un détecteur à diffusion de la lumière 18 angles (MALS) DAWN Heleos II (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US) équipé d'un QELS (DLS) à 99°, un réfractomètre OptilabRex (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US), et un détecteur UV-visible Agilent 1100 ($\lambda = 412 \text{ nm}$). Les détecteurs du MALS ont été normalisés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA). L'étalonnage de l'intensité de diffusion a été réalisé avec du toluène.

Le programme d'élution utilisé avait pour flux croisé : 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 2 min, 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour 38 min, diminuer à 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en 10 min puis fixé 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour 40 min. Le flux linéaire de sorti (Vout) a été fixé à $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et le flux d'injection (Vinj) à 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Biologie

Culture cellulaire

La lignée cellulaire HCT-116 (ATCC # CCL-247) est issue d'un carcinome colorectal humain, la lignée cellulaire FaDu (ATCC # HTB-43) a été générée à partir d'un carcinome épidermoïde humain. Les cellules HCT-116 et FaDu ont été cultivées dans DMEM (Invitrogen) contenant 4,5 g / L de glucose, GlutaMAX et du pyruvate, supplémenté avec 10% (v / v) de sérum bovin fœtal inactivé à la chaleur (FBS), 100 U / mL de pénicilline et 100 pg / mL de streptomycine. Les cellules ont été maintenues à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 .

Cytotoxicité et photocytotoxicité de micelles polymères chargées en Phéo

Ces tests ont été réalisés sur des cellules adhérentes 2D monocouches. Les cellules HCT-116 et FaDu ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (4 000 et 10 000 cellules par puits respectivement). La cytotoxicité des polymères auto-assemblés (1 μM , 10 μM , 100 μM) chargés en

Phéo (30/1 mol/mol) a été évaluée après 48 heures de temps d'incubation. La phototoxicité a été évaluée après 48 heures d'incubation à 37 ° C après une série de trois photoactivations, qui ont été réalisées avec un rétroprojecteur avec un filtre passe-bande ($\lambda > 400$ nm), ce qui représente une dose totale de $8,2 \text{ J.cm}^{-2}$. Les concentrations utilisées étaient pour le Phéo seul 0.033 μM , 0,33 μM et 3,3 μM , ce qui correspond aux mêmes concentrations dans les expériences avec les auto-assemblages de polymères chargés. La viabilité a été évaluée avec le réactif PrestoBlue (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Pour chaque série d'expériences, six répliques ont été produits et analysés.

Les différences statistiques entre les valeurs ont été évaluées par des tests de comparaison multiple de Dunnett qui comparent chaque condition avec leur contrôle respectif. Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM), et la signification statistique globale a été fixée à $p < 0,05$.

Génération de sphéroïdes de tumeur 3D

Les sphéroïdes HCT-116 et FaDu ont été produits par la technique non adhérente. En bref, 10 000 cellules FaDu ou 1 000 HCT-116 cellules ont étéensemencées dans 300 μL de milieu dans chaque puits des plaques Low-adhesion à 96 puits de Corning (Fisher Scientific, Illkirch, France). Les sphéroïdes ont été cultivés pendant 5 jours avant incubation avec les nano-vecteurs (ou Phéo libre ou auto-assemblages chargés en Phéo) à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 .

Thérapie photodynamique sur sphéroïdes

Les sphéroïdes HCT-116 et FaDu ont été incubés avec du Phéo libre ou encapsulé 30 min ($[\text{Phéo}] = 3 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{Phéo}]/[\text{polymère}] = 30/1 \text{ mol/mol}$) avant la première photoactivation. Les sphéroïdes ont été irradiés pendant 8 min à l'aide d'une lampe de rétroprojecteur avec un filtre passe-bande ($\lambda > 400$ nm). L'énergie totale reçue était de $8,2 \text{ J.cm}^{-2}$ (à savoir, 8 min d'irradiation = $8,2 \text{ J.cm}^{-2}$). Ensuite, une illumination de 8 min a eu lieu chaque 24 heures, sur une période de deux jours. Les sphéroïdes traités par PDT ont été observés par microscopie optique (Olympus BX53 équipé d'un objectif plan M N x5 à contraste de phase) 6h après la dernière photoactivation, i.e après 78h d'incubation avec les micelles polymères et pendant au moins 3 jours ou plus.

Analyse biologique des sphéroïdes

Photocytotoxicité des sphéroïdes

L'efficacité PDT a été évaluée en mesurant la surface des sphéroïdes vivants, qui a été extraite de l'image avec le logiciel ImageJ (figure 1) et l'évolution au cours du temps a été comparée. Afin de faciliter la visualisation des sphéroïdes, toutes les images de microscopie sont utilisées avec la couleur réelle détectée par la caméra couleur, la couleur venant du rouge phénol dans le milieu. Cependant, pour une compréhension plus aisée, les images en transmission seront présentées en noir et blanc. Les expériences ont été faites en hexaplicata et 2-3 images sélectionnées de manière aléatoire de chaque échantillon ont été analysées. Toutes les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM.

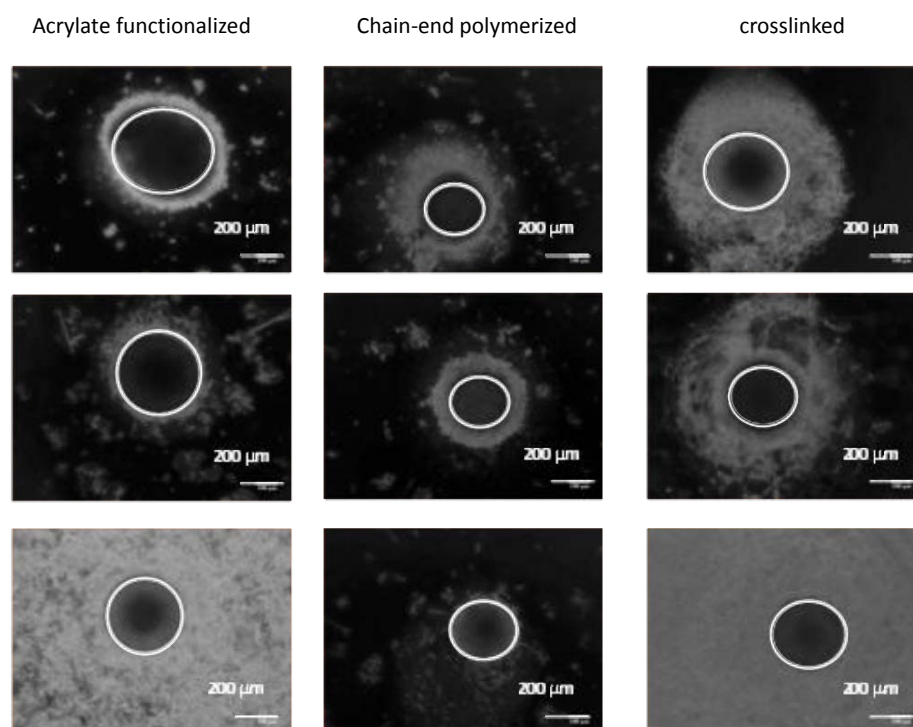


Figure 0-1. Exemple de délimitation des surfaces de sphéroïdes à partir de clichés de microscopie par fluorescence

Validation de méthode

Afin d'analyser la mort cellulaire dans les sphéroïdes, de nombreuses méthodes peuvent être utilisées, de la quantification d'ATP à la microscopie, mais un grand nombre d'entre elles sont destructrices et ont une grande incertitude. Dans notre cas, il était essentiel d'évaluer l'évolution du même sphéroïde au cours du temps afin d'être plus proche de la réalité. Nous avons donc besoin d'une méthode non destructive et la microscopie a déjà été utilisée dans la littérature pour évaluer la taille de la zone vivante dans des sphéroïdes. En raison de la présence de couronnes de cellules potentiellement mortes non détachées autour des sphéroïdes traités dans ce travail, nous avons estimé qu'il était important de certifier la fiabilité de cette méthode.

Deux certifications différentes ont été réalisées. Tout d'abord, la partie humaine de la méthodologie, qui peut être vérifiée par des mesures à différents moments, a été corrélée avec une analyse Pearson, car les données étaient paramétriques, le test de Spearman n'était pas nécessaire. Ces corrélations (figure 2) ont montré une très bonne stabilité de la méthode au cours du temps avec différents points de données.

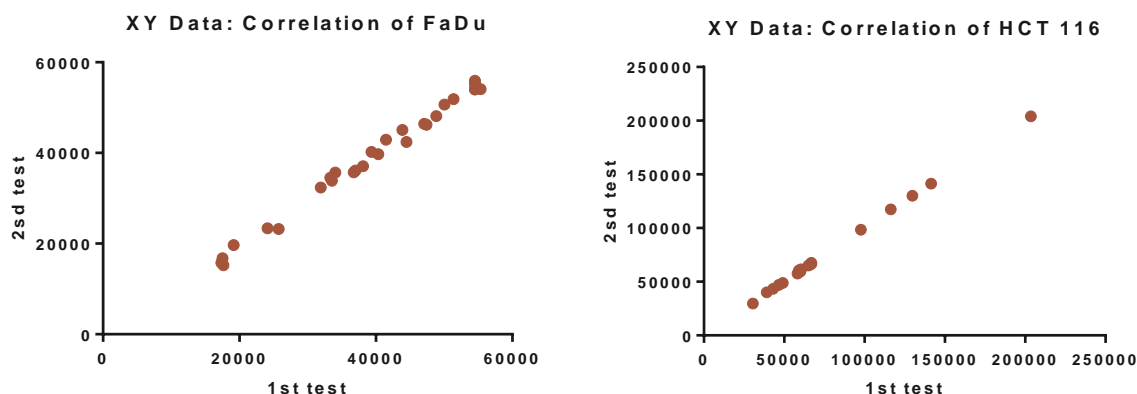


Figure 0-2 : Corrélation entre les deux tests.

La validité biologique a été évaluée dans une deuxième étape. Ceci a été réalisé par l'utilisation d'un kit de dosage de l'ATP. 32 sphéroïdes traités avec trois nano-objets différents ont ainsi été analysés en parallèle par le procédé optique et par le kit de dosage de l'ATP (de viabilité cellulaire Celltiter 3D-Glo, Promega). Les résultats sont présentés sur les figures 3 et 4.

La comparaison a été faite entre la concentration d'ATP des sphéroïdes traités divisée par la concentration de l'ATP du contrôle de la même lignée cellulaire, et le rapport en volume du sphéroïde traité divisé par son contrôle. Nous avons supposé que les sphéroïdes sont de forme sphérique, comme illustré dans les différentes images et que l'ATP est directement lié au nombre de cellules vivantes. Nous avons également supposé que ce nombre de cellules est directement lié au volume de sphéroïde, cette hypothèse n'est viable que parce que nous utilisons de petits sphéroïdes sans noyau nécrotique.

Avant de faire une corrélation, une vérification de toute différence statistiquement significative a été réalisée en utilisant la comparaison multiple de Sidak et des tests t: aucun d'eux ne permet de trouver une différence statistique entre les lignes. La corrélation de Pearson évalue enfin la méthodologie.

La fiabilité a été notée excellente pour la lignée HCT 116 (Pearson coefficient $r^2 = 0,9807$; $N = 32$) et pour la FaDu (Pearson coefficient $r^2 = 0,9788$; $N = 32$)

Le codage de l'image a également été testé: le même lot d'images a été analysé à deux mois d'intervalle, avec le même programme et de la même manière. En ce qui concerne le contrôle de l'ATP, un test Pearson a été utilisé pour évaluer la fiabilité qui a été marquée excellente pour les deux lignées de cellules HCT 116 (Pearson coefficient $r^2 = 0,9987$; $N = 80$) et FaDu (Pearson coefficient $r^2 = 0,9928$; $N = 120$).

Pour les sphéroïdes FaDu, les résultats sont très proches pour chaque méthode, en raison d'un noyau sphéroïde très compact permettant une bonne visualisation de sa limite. Pour HCT116, la méthode microscopique a légèrement surestimé le rapport des cellules vivantes/mortes, en raison d'un noyau pas aussi dense. L'évaluation de cellules vivantes par le procédé de microscopie optique est donc validée.

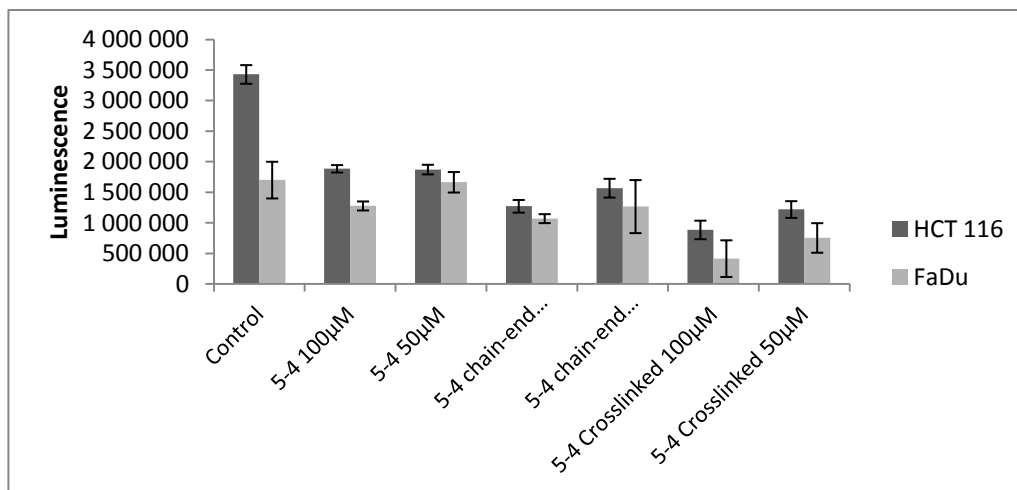


Figure 0-3 : Résultat du test ATP sur les sphéroïdes

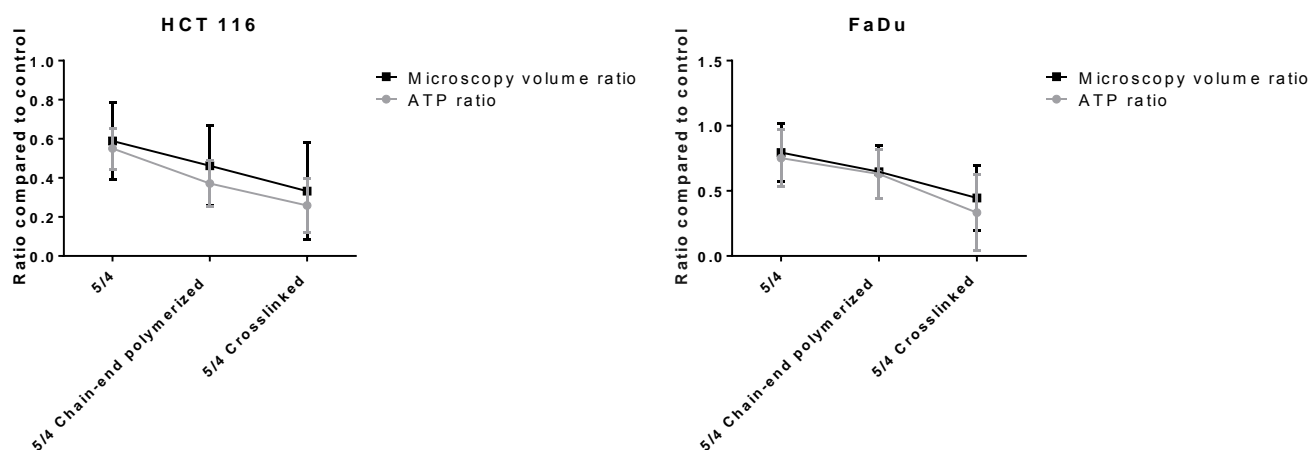


Figure 0-4 : Comparaison des méthodes par lignée cellulaire

Le Logiciel STORMS

Development and use of STORMS software

Ce texte a été rédigé pour des articles. dans le document final, il sera en français

The Malvern software is very efficient to acquire experimental data and to analyze them in a predefined way. However, changing the parameters of such an analysis and comparing various models are not so easy even if one can modify in a step-by-step and repeating way the details of each data treatment. Furthermore, the Malvern software is often just a black box: very little information is available concerning the various calculations and assumptions made for an analysis.

STORMS program is a software purely designed for the analysis of data and offering an easy choice in the methods used to extract information from the correlograms, to evaluate the distributions in intensity then in number. Implementation of different models describing non spherical particles, of mathematical treatment of correlograms, of scattering properties models have been made to test various possibilities and adjust the analysis depending on the type of samples. Pre-selected parameters were chosen in order to describe easily micelles and vesicles made of organic compounds such as surfactants or polymers, or mixtures of them. Finally, a routine of this software calculates the theoretical correlogram of a solution containing various particles. This may then be analyzed and compared to experimental data.

Figure S1 presents a screen copy showing the overall presentation of the software with the different parameters that can be changed. The program uses exported correlograms from Malvern. The fitting method can be adjusted, together with the regularization parameter (alpha), the distribution range, the expansion parameter (leading to the favored use of first points of the correlograms) and the weighting parameter. The geometry of the particle can also be adapted from spheres, ellipsoid, nano-rods or worm-like systems. Finally, the morphology of the scattering object can be chosen between full spheres, coated spheres, vesicles or mixtures.

In the right part of the window, the correlogram is shown together with the fitting (red curve), followed by the residual, the intensity relative analysis and the number relative one.

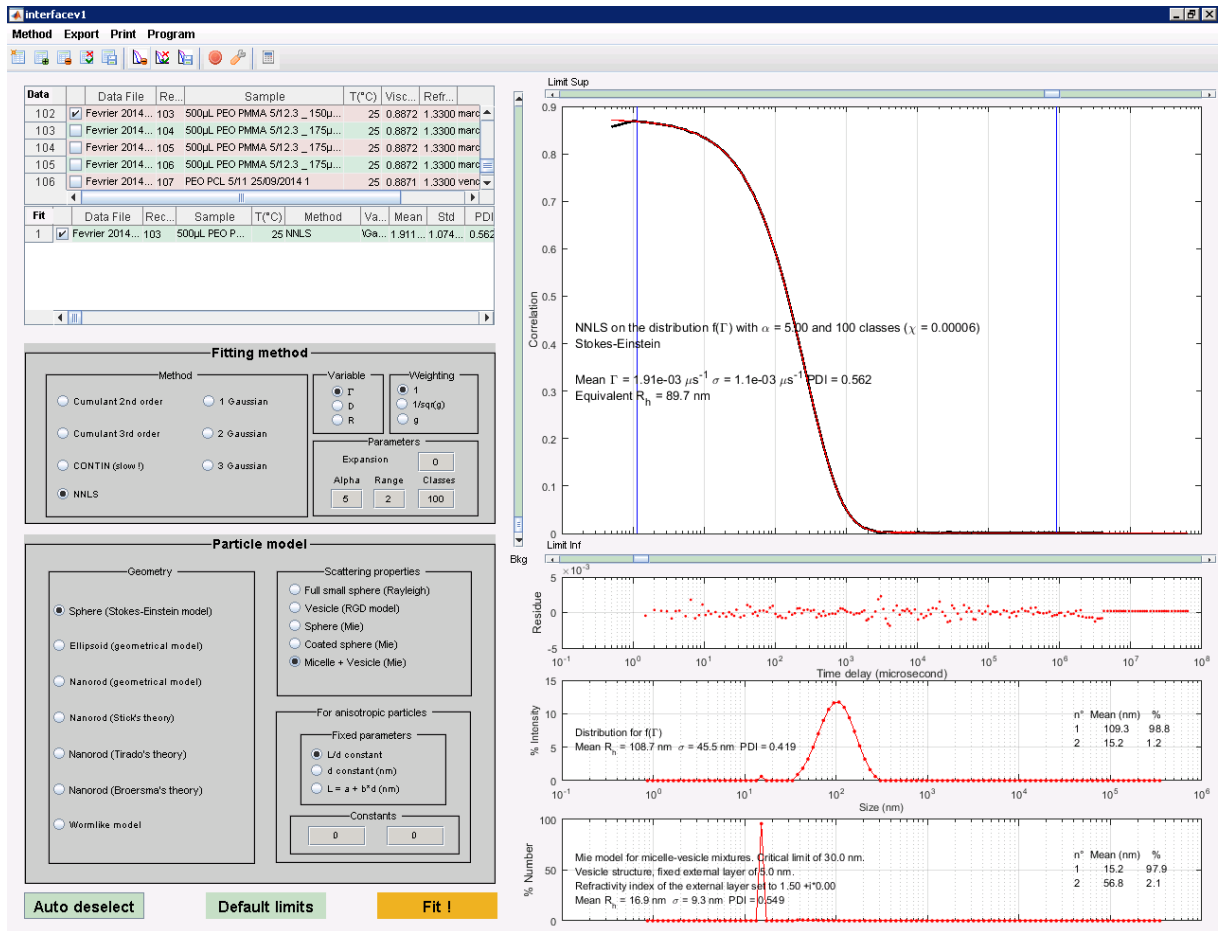


Figure 0-1 : Logiciel STORMS

In a more precise way, STORMS has been written and compiled with MATLAB (version R2015b).

The Cumulant method was based on the paper of B.J Frisken (Frisken, B. J. (2001). Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Opt.*, 4087-91) with the fitting of the autocorrelation function using the equation:

$$g^{(2)}(\tau) = B + \beta \cdot e^{-2\bar{\Gamma}\tau} \cdot \left(1 + \frac{\mu_2}{2!} \cdot \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \cdot \tau^3 + \dots\right)^2$$

where B is the background value, β the amplitude of the autocorrelation function, $\bar{\Gamma}$ the mean value of the decay rates and μ_n the n^{th} moment of the distribution of decay rates, $f(\Gamma)$. The moments about the mean are defined as:

$$\mu_n = \int_0^\infty f(\Gamma) \cdot (\Gamma - \bar{\Gamma})^n d\Gamma$$

and are related to the cumulants.

This analysis leads to the so-called PDI (polydispersity index) is defined as the ratio between the second moment of the distribution divided by the square of the mean value of the decay rate. Generally speaking, the estimated PDI in STORMS is much larger than the one calculated by the MALVERN software since all the experimental points are selected and the second order equation is used in STORMS instead of the third one for Malvern.

Non-Negatively constrained Least Squares (NNLS) algorithm is using a regularization process, called the second-order Tikhonov regularizer. The importance of the regularization is modified by a parameter λ , which is estimated through the minimization of a Lagrange function (see Hansen, P. C. (2008). *Regularization Tools. A Matlab Package for Analysis and Solution of Discrete Ill-Posed Problems*. www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange and *Numer. Algor.* **46** (2007) 189-94.).

The CONTIN method, originally developed by S. W. Provencher (Provencher, S. W. (1984) <http://s-provencher.com/pages/contin.shtml> and *Comput. Phys. Com.* **27** (1982) 229-42.) was included in STORMS through a routine largely using codes written by I.-G. Marino and available on the web (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/6523-rilt>).

For the calculation of the Mie model, a routine based on the program written by J. Schäfer (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/36831-matscat>) was developed.

STORMS allows one to select and weight the experimental points of each correlogram. In the current paper, all these points were kept and had the same weight (except in the tests of table 2).

Utilisation du logiciel STORMS

Le logiciel a été utilisé en comparaison avec celui de Malvern (Figure 0-2)

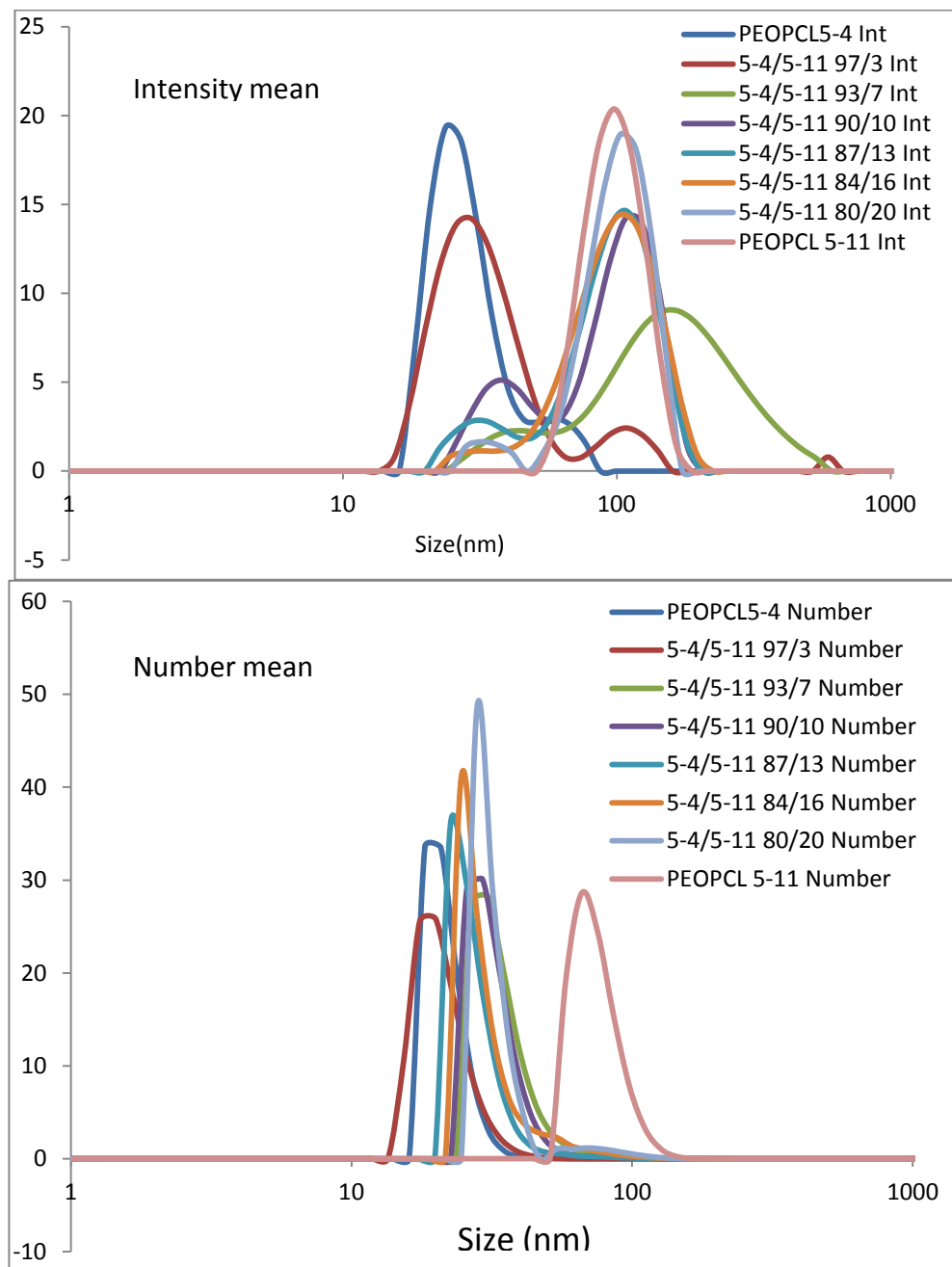


Figure 0-2 : Analyse DLS du mélange PEO-PCL 5 000-4 000/ PEO-PCL 5 000-11 000 par Storms.

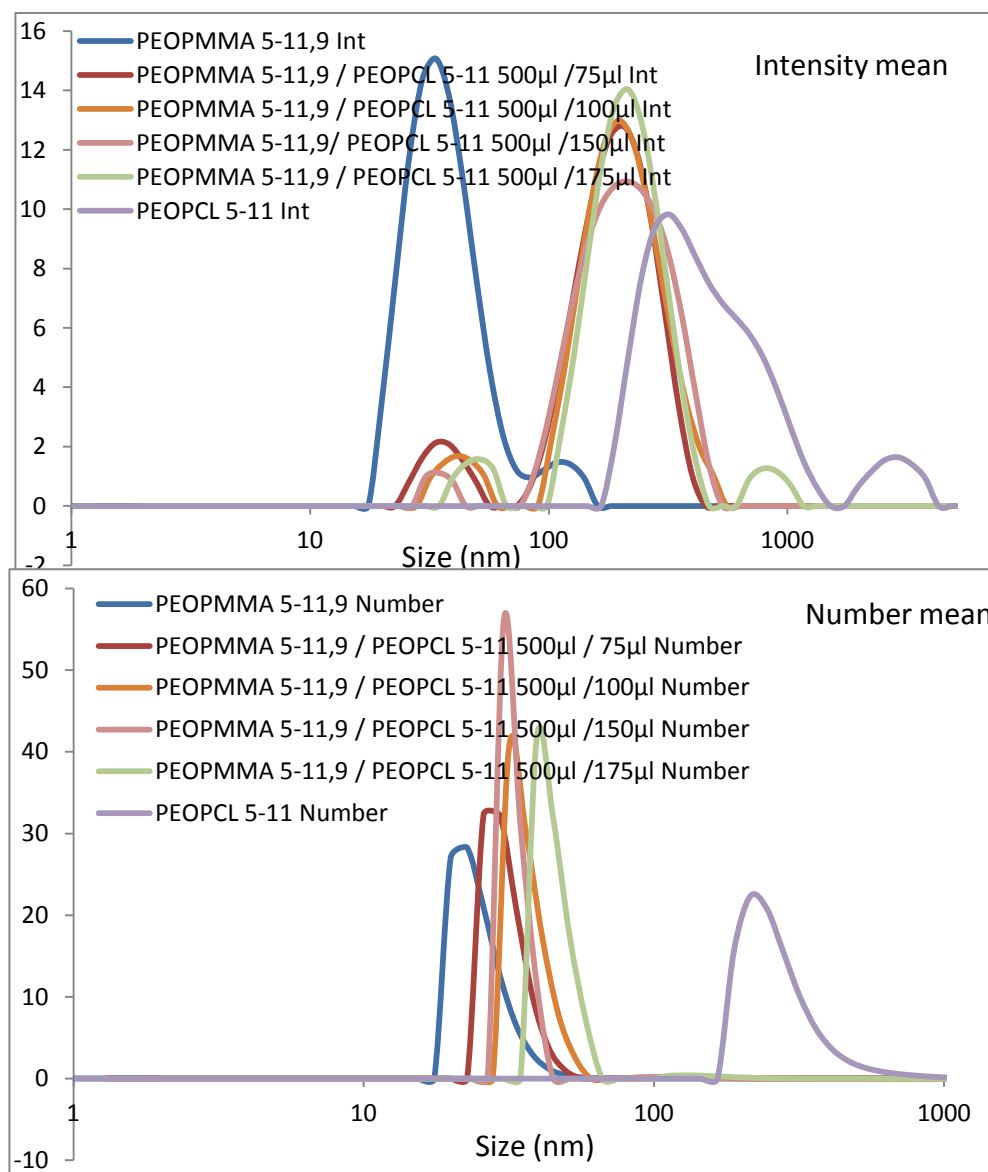


Figure 0-3 : Analyse DLS du mélange PEO-PMMA5 000-11 000.9/ PEO-PCL 5 000-11 000 par Storms

Pour ce qui est des comparaisons, le logiciel STORMS permet à première vue une meilleure approche que le logiciel Malvern, plus proche de l'analyse attendue, du moins en intensité, pour les deux mélanges. Dans le cas de l'analyse en nombre il se comporte comme le logiciel Malvern ayant une grande difficulté à ressortir les deux pics dans des proportions appréciables et tels qu'ils devraient être.

Mixture	STORMS						MALVERN			
	diam int	% int	PDI int	diam number	% number	PDI number	diam int	% Int	PDI	diam number
PEO PCL 5/4	27,6	89	0,4	21,6		0,17	27		0,26	17,7
	60	11								
PEO PCL 5/4 97/3 PEO PCL 5/11	32	88	1,3	21		0,23	28	80	0,33	17,8
	104	10					468	20		
PEO PCL 5/4 93/7 PEO PCL 5/11	182	89	0,6	34		0,3	212	87	0,43	23,7
	42	11					34	11		
PEO PCL 5/4 90/10 PEO PCL 5/11	110	74	0,42	32		0,25	116	91	0,28	16,6
	52	26					23	9		
PEO PCL 5/4 87/13 PEO PCL 5/11	103,6	86	0,39	28		0,28	109		0,26	15,5
	33,6	14								
PEO PCL 5/4 84/16 PEO PCL 5/11	100		0,35	31,2		0,37	115	98	0,22	14,3
							17	2		
PEO PCL 5/4 80/20 PEO PCL 5/11	104	94	0,28	31	94	0,32	112		0,18	53
	34	6		76	6					
PEO PCL 5/11	99,6		0,23	88		0,25	106		0,1	60

Tableau 0-1 : Comparaison des résultats DLS obtenues avec le logiciel Malvern et STORM pour le mélange PEO-PCL 5 000-4 000/PEO-PCL 5 000-11 000

mixture	STORMS						MALVERN			
	diam int	% int	PDI int	diam number	% number	PDI number	diam int	% int	PDI	diam number
PEO PMMA 5/11.9	36	93	8,9	25		0,22	35,5		0,26	20
PEO PMMA 5/11.9 86/14 PEO PCL 5/11	218	91	0,43	33		0,26	221		0,3	20,2
	40	9								
PEO PMMA 5/11.9 82/18 PEO PCL 5/11	218	93	0,43	36		0,3	222		0,3	116
	42	7								
PEO PMMA 5/11.9 77/23 PEO PCL 5/11	224		0,42	32		0,33	248		0,27	112
PMMA 5/11.9 74/26 PEO PCL 5/11	220	91	0,62	44	98	0,37	232		0,34	119
	50	5								
PEOPCL 5-11	576		11,8	276		0,44	475		0,39	145

Tableau 0-2 : Comparaison des résultats DLS obtenues avec le logiciel Malvern et STORM pour le mélange PEO-PMMA 5 000-11 000.9/PEO-PCL 5 000-11 000

Pour les deux familles de mélange, les résultats relatifs à l'intensité sont proches par les deux logiciels. De petites variations sont parfois observées pour une deuxième population.

Pour l'analyse par rapport au nombre, le problème est plus complexe et les différents résultats obtenus sont parfois très loin du résultat réel, en raison des possibles différentes propriétés de diffusion. En effet, le logiciel Malvern considère toujours la théorie de diffusion de Mie pour les objets remplis sphériques. Dans STORMS, l'option étant proposée, un mélange de micelles et des vésicules a été choisi. On a donc théoriquement un système plus proche celui mise en œuvre artificiellement et donc de nos attentes.

Figures

DLS-TEM

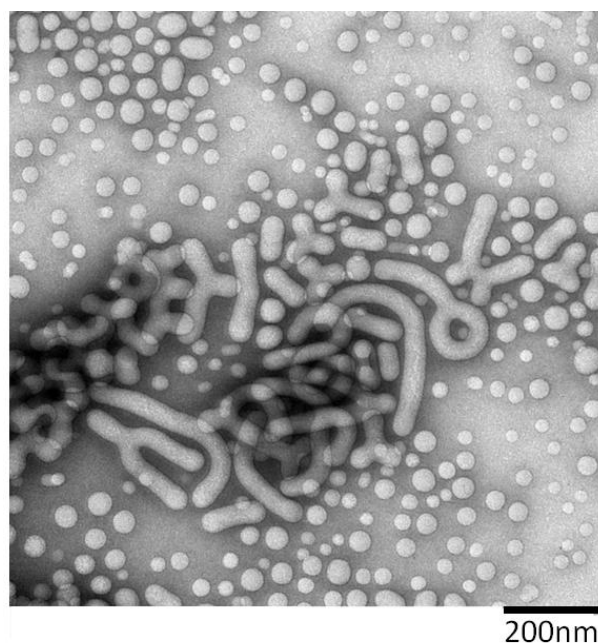


Figure 0-1 : PEO-PS 6000-19500

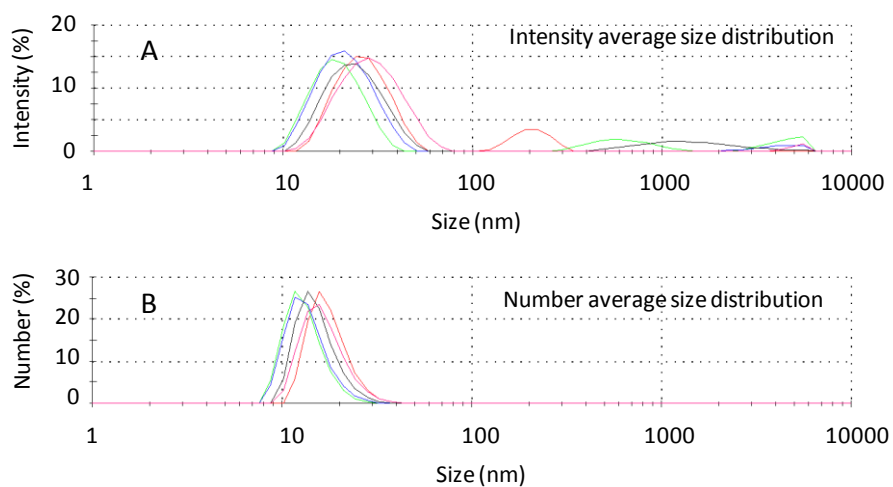


Figure 0-2 : DLS, intensité et nombre, rouge PEO(2000)-b-PDLLA(2200), vert PEO(3100)-b-PS(2300), bleu PEO(2000)-b-PCL(2800), noir PEO(5000)-b-PCL(4000), rose PEO(2400)-b-PDLLA(2000).

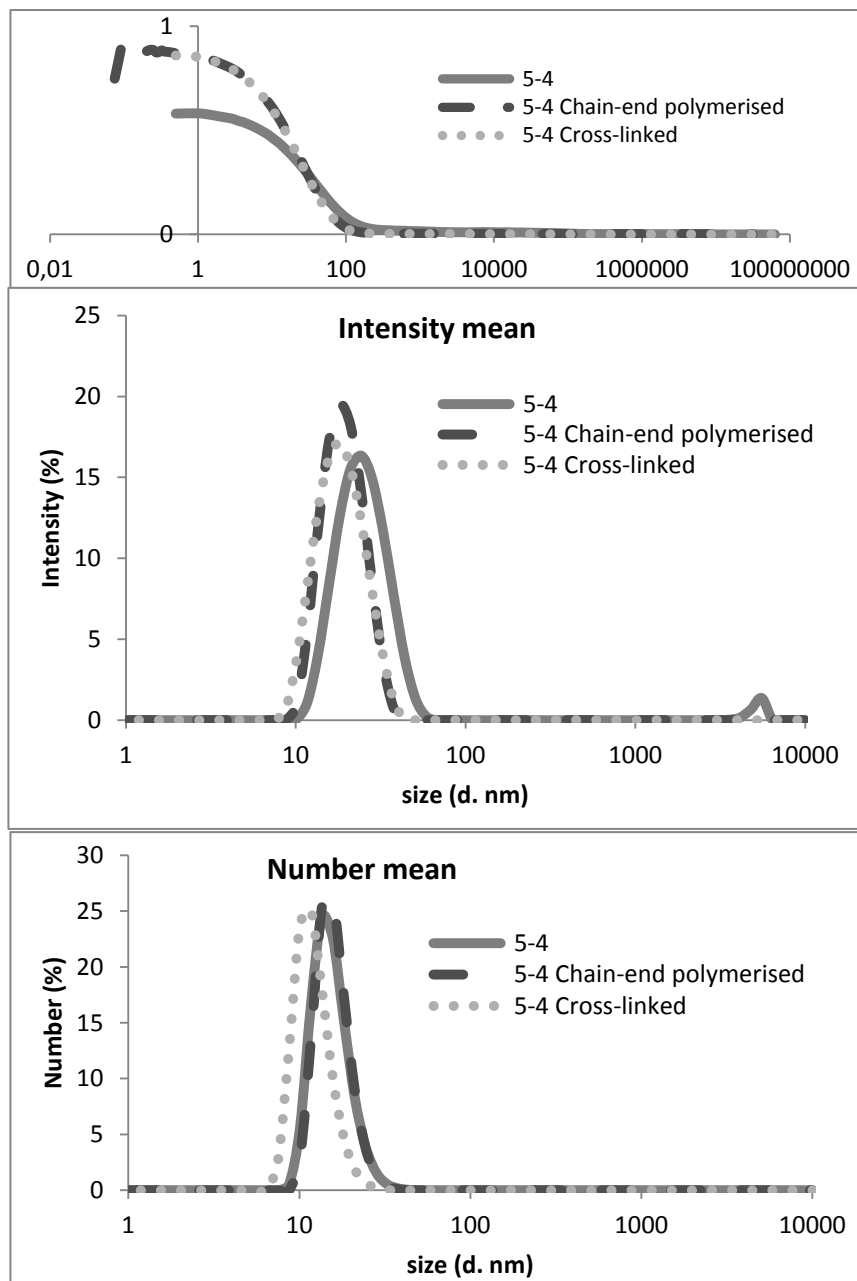


Figure 0-3 : DLS du PEO-PCL 5000-4000 à différentes réticulations

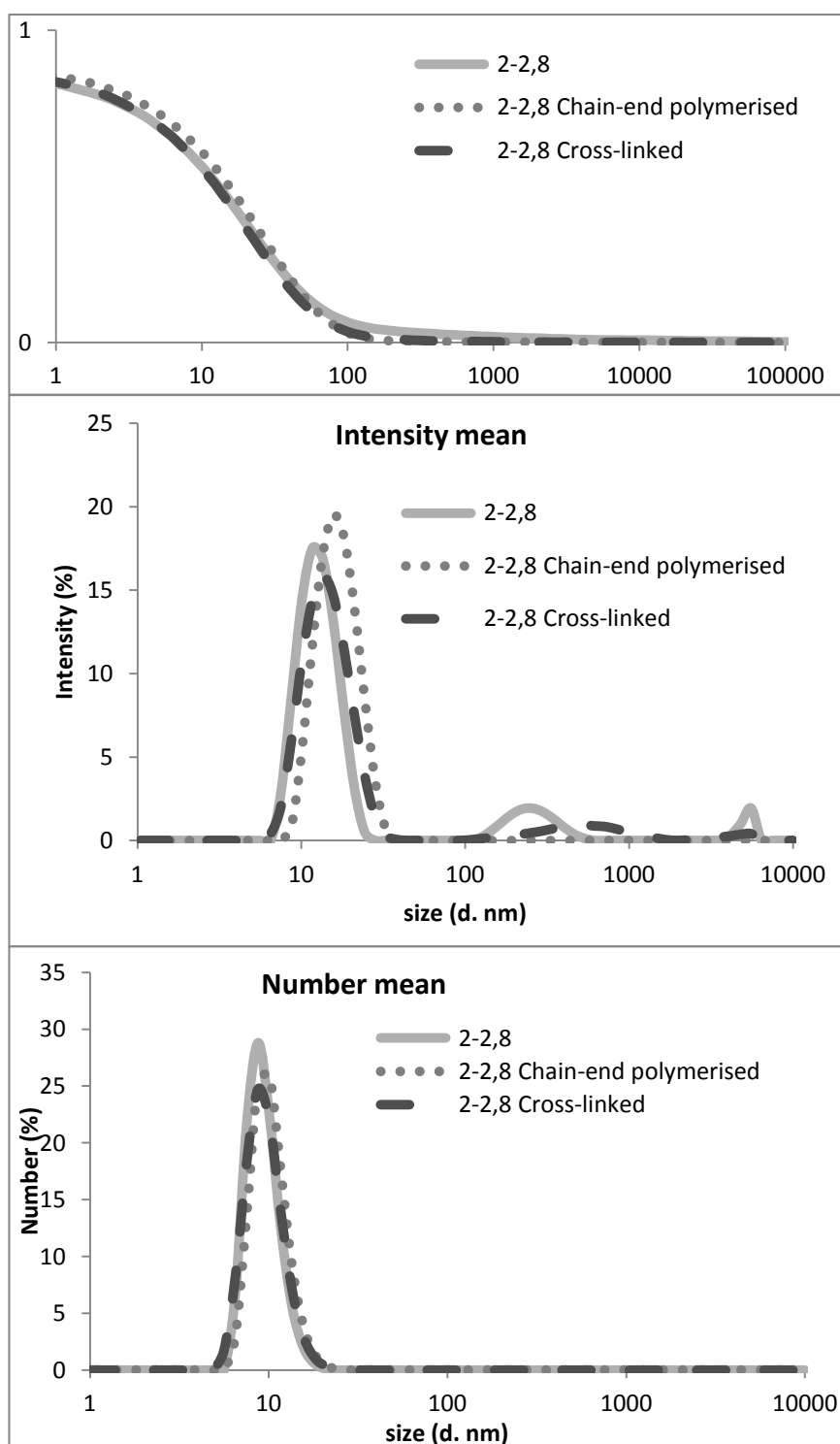


Figure 0-4 : DLS du PEO-PCL 2000-2800 à différents degrés de réticulation

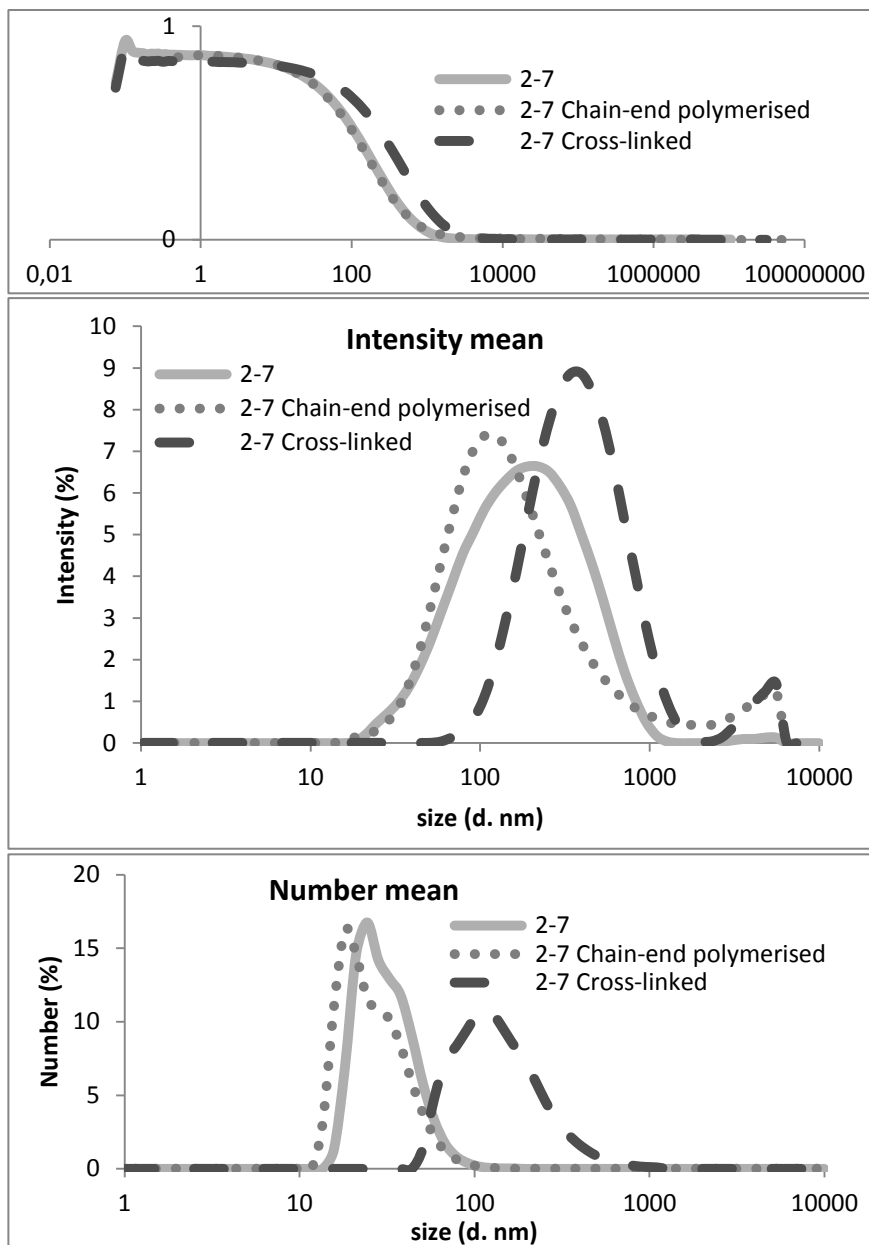


Figure 0-5 : DLS du PEO-PCL 2000-7000 à différents degrés de réticulation

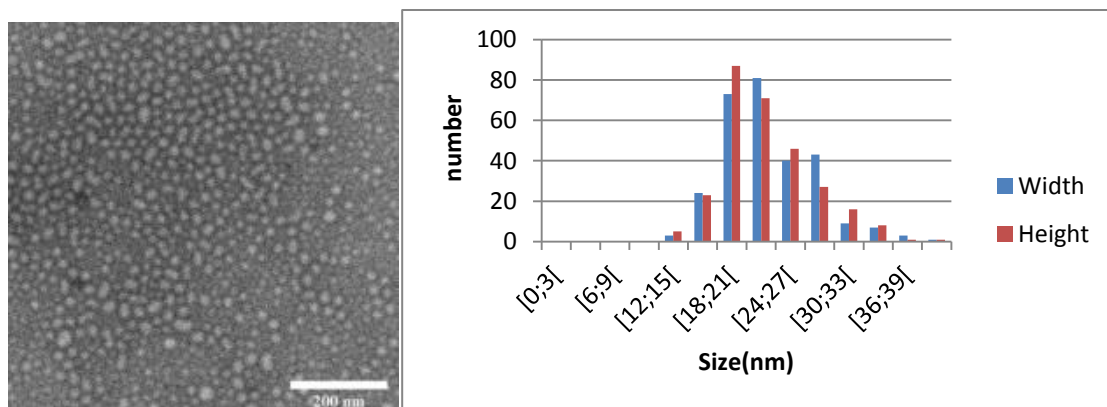
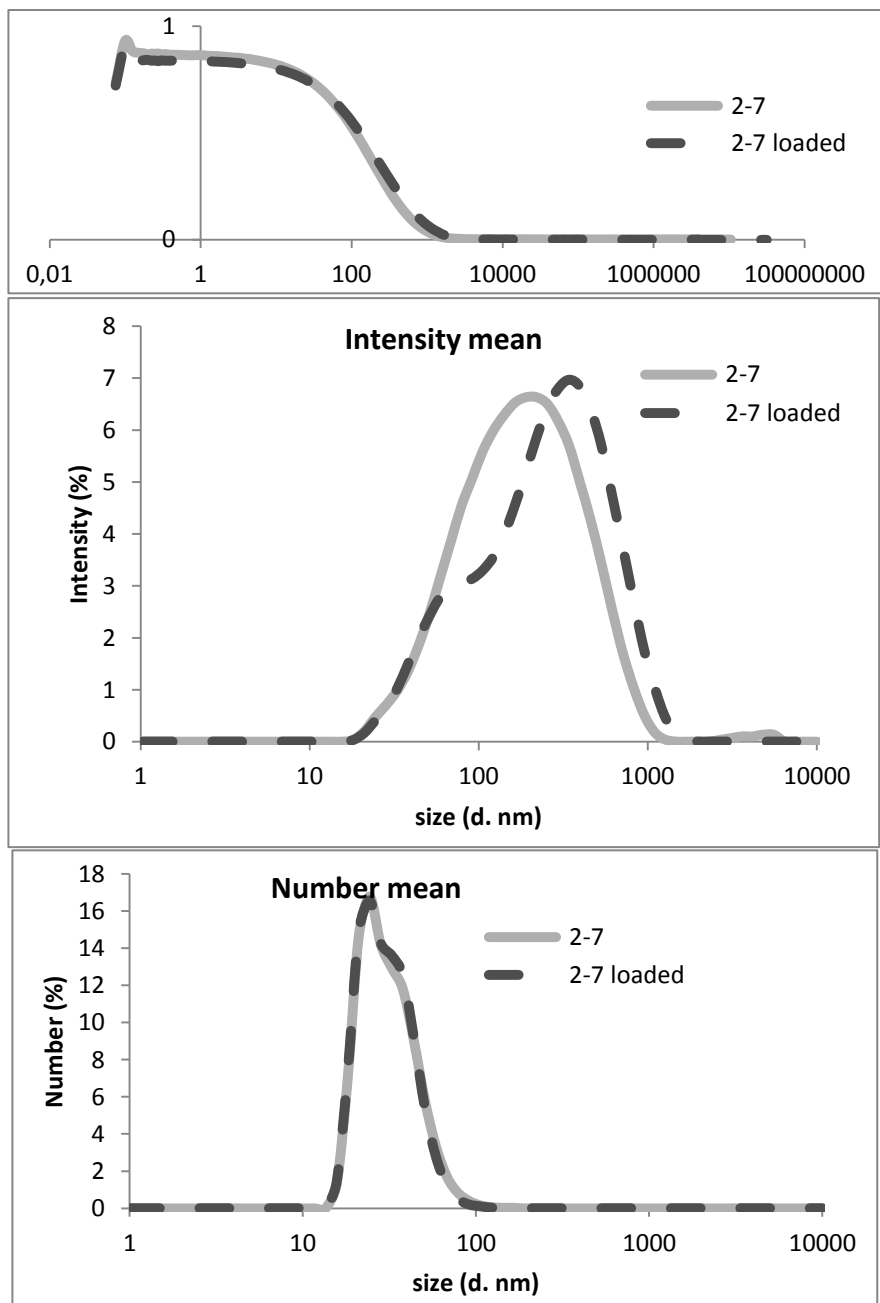
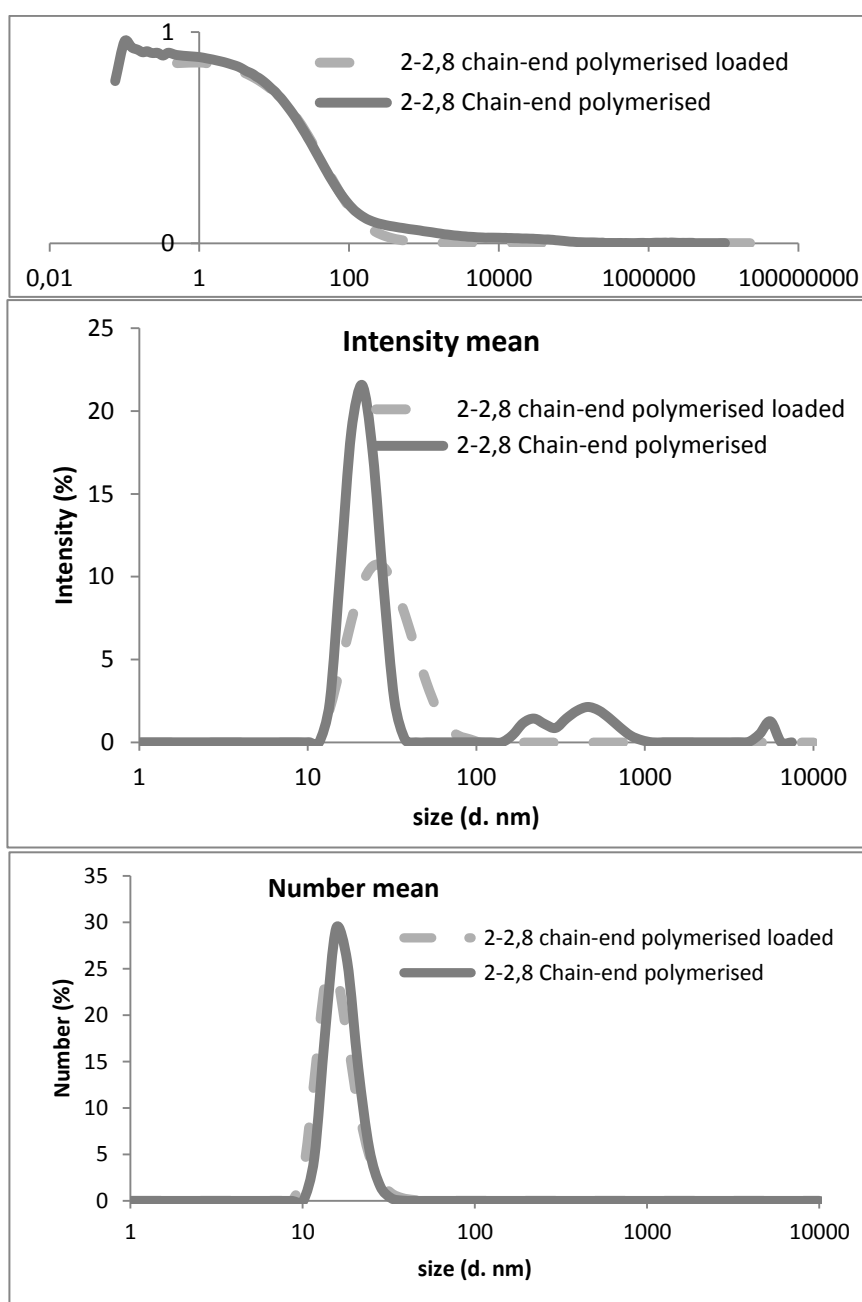


Figure 0-6 : TEM et analyse TEM du PEO-PCL 5000-4000

TEM	Water swelling	Sonication
PEO-PCL 2000-7000		
Analysis	Objects from 40 to 400nm long, 20-25 nm wide	Objects from 20 to 300nm long, 20-30 nm wide

Figure 0-7 : Evolution des objets PEO-PCL 2000-7000 au cours de la formation





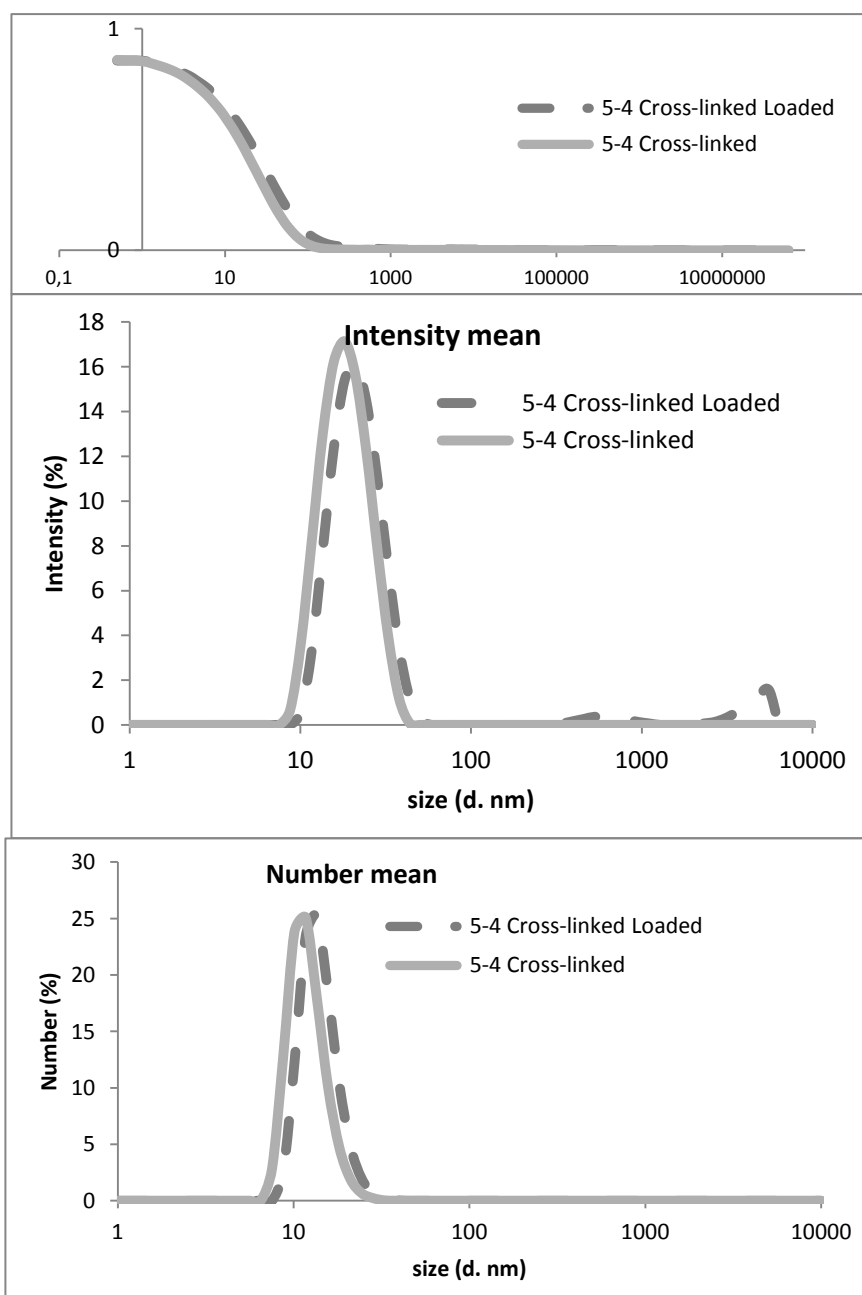


Figure 0-8 : DLS de tenue à la charge de divers polymères

Analyse UV-Visible

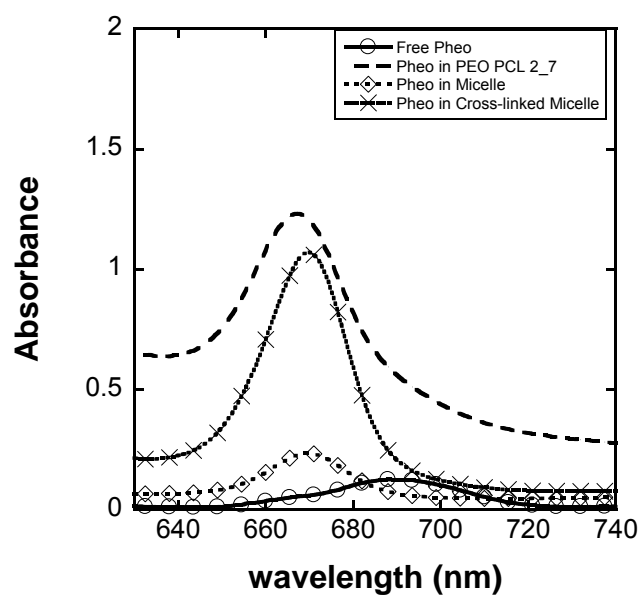


Figure 0-9 : Analyse de l'absorbance des différents objets chargés en UV

Effet du Phéophorbide-A non vectorisé

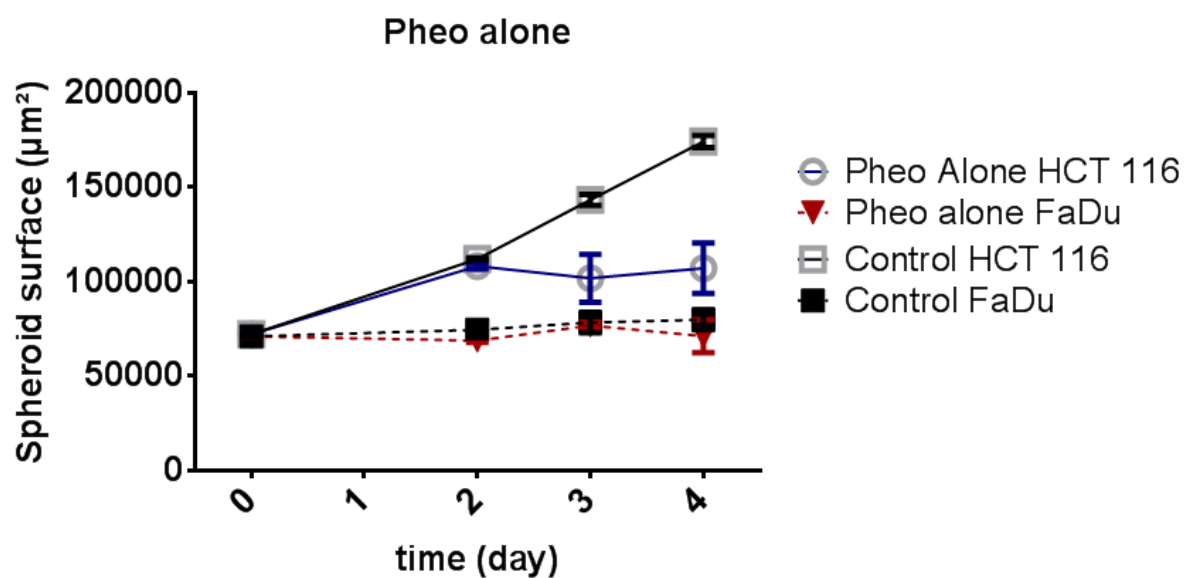


Figure 0-10 : Phéo seul sur les Sphéroïdes à 3.3μM montrant une efficacité presque nulle

Analyse AsFFFF complémentaires

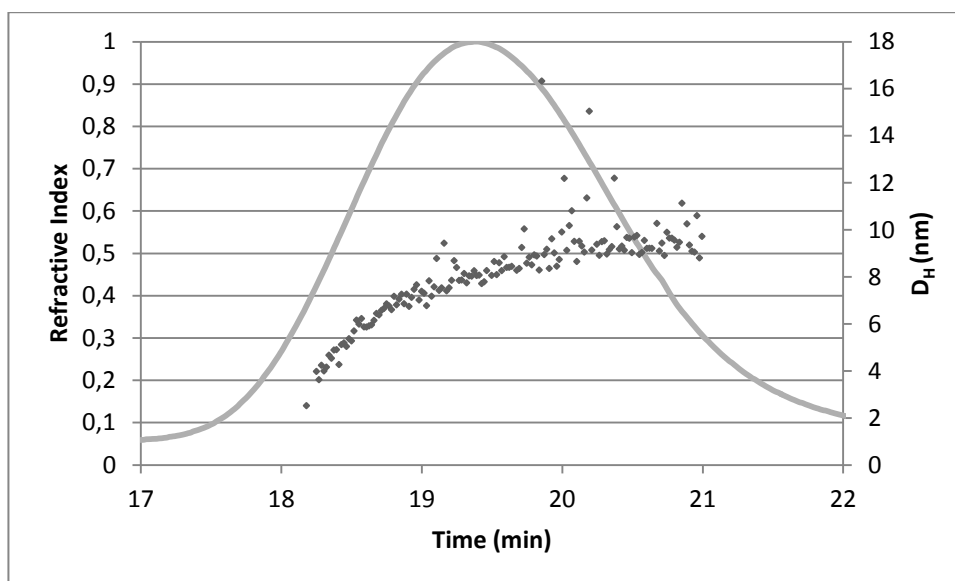


Figure 0-11 : Fractogramme du PEO-PCL 2000-2800 présentant l'évolution du D_H au cours du temps

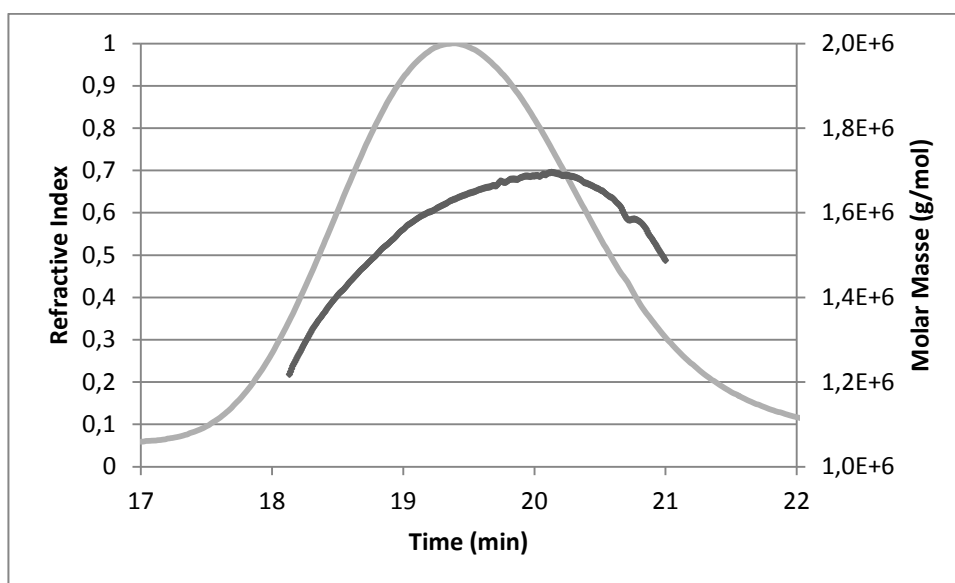


Figure 0-12 : Fractogramme du PEO-PCL 2000-2800 présentant l'évolution de la masse molaire au cours du temps

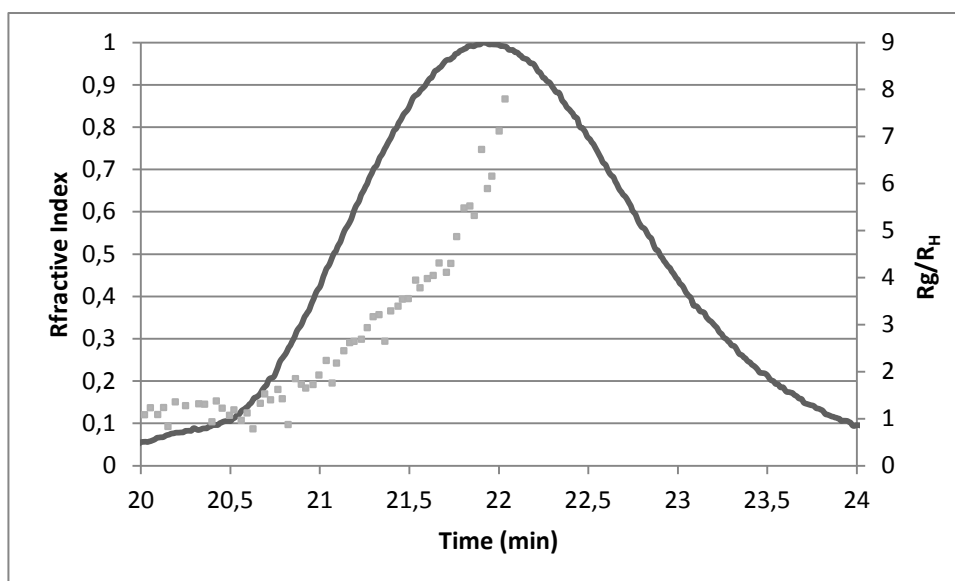


Figure 0-13 : Fractogramme du PEO-PCL 2000-7000 Présentant l'évolution du R_g/R_H au cours du temps par des points

Références

Références :

1. Till, U., et al., *Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi-elastic light scattering for characterization of polymersomes: comparison with classical techniques*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014: p. 1-13.
2. Henderson, B.W. and D.A. Bellnier, *Tissue localization of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction*. Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, 1989: p. 112-130.
3. Schenck, G.O., *PHOTOSENSITIZATION*. Industrial & Engineering Chemistry, 1963. **55**(6): p. 40-43.
4. Foote, C.S., *Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems*. Free radicals in biology, 1976. **2**: p. 85-133.
5. Wasserman, H.H. and B.H. Lipshutz, *Reactions of singlet oxygen with heterocyclic systems*, in *Singlet Oxygen*. 1979, Academic Press New York. p. 430-509.
6. Steenken, S. and S.V. Jovanovic, *How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(3): p. 617-618.
7. Moan, J., *On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1990. **6**(3): p. 343-344.
8. Moan, J. and S. Sommer, *Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells*. Cancer Research, 1985. **45**(4): p. 1608-1610.
9. Mitchell, J.B., et al., *Oxygen Dependence of Hematoporphyrin Derivative-induced Photoinactivation of Chinese Hamster Cells*. Cancer Research, 1985. **45**(5): p. 2008-2011.
10. Mitra, S., et al., *Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1 α* . American Association for Cancer Research, 2006. **5**(12): p. 3268-3274.
11. Ji, Z., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1 α overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy*. Cancer Letters, 2006. **244**(2): p. 182-189.
12. Vaupel, P., et al., *Oxygenation of Human Tumors: Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast Cancers by Computerized O₂ Tension Measurements*. Cancer Research, 1991. **51**(12): p. 3316-3322.
13. Hatz, S., J.D.C. Lambert, and P.R. Ogilby, *Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2007. **6**(10): p. 1106-1116.
14. Hatz, S., L. Poulsen, and P.R. Ogilby, *Time - resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration*. Photochemistry and photobiology, 2008. **84**(5): p. 1284-1290.
15. Niedre, M., et al., *Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid*. British journal of cancer, 2005. **92**(2): p. 298-304.
16. Dougherty, T.J., *Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin® II*. Photochemistry and photobiology, 1987. **46**(5): p. 569-573.
17. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Journal of medicinal chemistry, 2004. **47**(16): p. 3897-3915.

18. Ferrand, Y., et al., *Hydroporphyrins as tumour photosensitizers: synthesis and photophysical studies of 2, 3-dihydro-5, 15-di (3, 5-dihydroxyphenyl) porphyrin*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2003. **13**(5): p. 833-835.
19. Sekkat, N., et al., *Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics*. Molecules, 2011. **17**(1): p. 98-144.
20. Sobolev, A., D. Jans, and A. Rosenkranz, *Targeted intracellular delivery of photosensitizers*. Progress in biophysics and molecular biology, 2000. **73**(1): p. 51.
21. Konan, Y.N., R. Gurny, and E. Allémann, *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology, 2002. **66**: p. 89-106.
22. Derycke, A.S. and P.A. de Witte, *Liposomes for photodynamic therapy*. Advanced drug delivery reviews, 2004. **56**(1): p. 17-30.
23. Damoiseau, X., et al., *Increase of the photosensitizing efficiency of the bacteriochlorin a by liposome incorporation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology, 2001. **60**: p. 50-60.
24. Kuntsche, J., et al., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **40**: p. 305-315.
25. Couleaud, P., et al., Nanoscale, 2010. **2**: p. 1083.
26. Ehrhart, J., A.-F. Mingotaud, and F. Violleau, *Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi elastic light scattering for characterization of poly(ethyleneglycol-b-ε-caprolactone) block copolymer self-assemblies used as drug carriers for photodynamic therapy*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(27): p. 4249-4256.
27. Cole, A.J., V.C. Yang, and A.E. David, *Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles*. Trends in Biotechnology, 2011. **29**(7): p. 323-332.
28. Kievit, F.M. and M. Zhang, *Cancer nanotheranostics: improving imaging and therapy by targeted delivery across biological barriers*. Advanced materials, 2011. **23**(36).
29. Bangham, A.D. and R. Horne, *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. Journal of molecular biology, 1964. **8**(5): p. 660IN2-668IN10.
30. Bangham, A., J. Dingle, and J. Lucy, *Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series*. Biochemical Journal, 1964. **90**(1): p. 133.
31. Birrenbach, G. and P. Speiser, *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology*. Journal of pharmaceutical sciences, 1976. **65**(12): p. 1763-1766.
32. Bangham, A., *Properties and uses of lipid vesicles: an overview*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1978. **308**(1): p. 2-7.
33. Danhier, F., et al., *Active and passive tumor targeting of a novel poorly soluble cyclin dependent kinase inhibitor, JNJ-7706621*. International journal of pharmaceuticals, 2010. **392**(1): p. 20-28.
34. Danhier, F., O. Feron, and V. Préat, *To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2010. **148**(2): p. 135-146.
35. Iyer, A.K., et al., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*. Drug discovery today, 2006. **11**(17): p. 812-818.
36. Prabhakar, U., et al., *Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology*. Cancer research, 2013. **73**(8): p. 2412-2417.

37. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**: p. 206-212.
38. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(6): p. 473-480.
39. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature nanotechnology, 2007. **2**(12): p. 751-760.
40. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer research, 1986. **46**(12 Part 1): p. 6387-6392.
41. Liu, J., et al., *Multiplexed detection and characterization of rare tumor cells in Hodgkin's lymphoma with multicolor quantum dots*. Analytical chemistry, 2010. **82**(14): p. 6237-6243.
42. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**(5): p. 631-651.
43. Hobbs, S.K., et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(8): p. 4607-4612.
44. Yuan, F., et al., *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*. Cancer research, 1995. **55**(17): p. 3752-3756.
45. Eetezadi, S., S.N. Ekdawi, and C. Allen, *The challenges facing block copolymer micelles for cancer therapy: In vivo barriers and clinical translation*. Advanced drug delivery reviews, 2015. **91**: p. 7-22.
46. Lee, H., et al., *The Effects of Particle Size and Molecular Targeting on the Intratumoral and Subcellular Distribution of Polymeric Nanoparticles*. Molecular Pharmaceutics, 2010. **7**(4): p. 1195-1208.
47. Kwon, G.S. and K. Kataoka, *Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles*. Advanced drug delivery reviews, 1995. **16**(2): p. 295-309.
48. Allen, C., et al., *Cellular internalization of PCL20-b-PEO44 block copolymer micelles*. Biomedica Biochimica Acta, 1999. **1421**: p. 32-38.
49. Yamamoto, Y., et al., *Long-circulating poly (ethylene glycol)–poly (D, L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge*. Journal of Controlled Release, 2001. **77**(1): p. 27-38.
50. Jain, R.K. and T. Stylianopoulos, *Delivering nanomedicine to solid tumors*. Nature reviews Clinical oncology, 2010. **7**(11): p. 653-664.
51. Dreher, M.R., et al., *Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers*. Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(5): p. 335-344.
52. Cabral, H., et al., *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*. Nature nanotechnology, 2011. **6**(12): p. 815-823.
53. Gray, B.P., S. Li, and K.C. Brown, *From phage display to nanoparticle delivery: functionalizing liposomes with multivalent peptides improves targeting to a cancer biomarker*. Bioconjugate chemistry, 2013. **24**(1): p. 85-96.
54. Cheng, Z., et al., *Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities*. Science, 2012. **338**(6109): p. 903-910.
55. Pirollo, K.F. and E.H. Chang, *Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?* Trends in biotechnology, 2008. **26**(10): p. 552-558.

56. Kirpotin, D.B., et al., *Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models*. Cancer research, 2006. **66**(13): p. 6732-6740.
57. Heneweer, C., et al., *Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: 89Zr-albumin as a model system*. Journal of Nuclear Medicine, 2011. **52**(4): p. 625-633.
58. Horcajada, P., et al., *Metal-organic frameworks in biomedicine*. Chemical reviews, 2011. **112**(2): p. 1232-1268.
59. Barreto, J.A., et al., *Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy*. Advanced Materials, 2011. **23**(12).
60. Vauthier, C. and P. Couvreur, *Nanomedicines: A New Approach for the Treatment of Serious Diseases*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**: p. 223-234.
61. Fang, C., et al., *In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **27**(1): p. 27-36.
62. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(3): p. 136-151.
63. Knop, K., et al., *Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(36): p. 6288-6308.
64. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 113-131.
65. Yokoyama, M., et al., *Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates*. Bioconjugate chemistry, 1992. **3**(4): p. 295-301.
66. Wiedmann, T.S. and L. Kamel, *Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles*. Journal of pharmaceutical sciences, 2002. **91**(8): p. 1743-1764.
67. Mall, S., G. Buckton, and D. Rawlins, *Dissolution behaviour of sulphonamides into sodium dodecyl sulfate micelles: A thermodynamic approach*. Journal of pharmaceutical sciences, 1996. **85**(1): p. 75-78.
68. Yokoyama, M., et al., *Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer*. Cancer Research, 1990. **50**: p. 1693-1700.
69. Torchilin, V.P., *Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems*. Journal of controlled release, 2001. **73**(2): p. 137-172.
70. Tomalia, D., et al., *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic*. Polymer Journal, 1985. **17**(1): p. 117-132.
71. Hawker, C.J. and J. Fréchet, *Control of surface functionality in the synthesis of dendritic macromolecules using the convergent-growth approach*. Macromolecules, 1990. **23**(21): p. 4726-4729.
72. Mammen, M., S.-K. Choi, and G.M. Whitesides, *Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**(20): p. 2754-2794.
73. Boas, U. and P.M.H. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. Chemical Society Reviews, 2004. **33**(1): p. 43-63.

74. Loup, C., et al., *Preparation of Water - Soluble Cationic Phosphorus - Containing Dendrimers as DNA Transfecting Agents*. Chemistry – A European Journal, 1999. **5**(12): p. 3644-3650.
75. Caminade, A.M., C.O. Turrin, and J.P. Majoral, *Dendrimers and DNA: combinations of two special topologies for nanomaterials and biology*. Chemistry–A European Journal, 2008. **14**(25): p. 7422-7432.
76. Sciortino, F., et al., *Simple Engineering of Polymer–Nanoparticle Hybrid Nanocapsules*. ChemNanoMat, 2016.
77. Couvreur, P., C. Dubernet, and F. Puisieux, *Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 1995. **41**(1): p. 2-13.
78. Kim, H.R., K. Andrieux, and P. Couvreur, *PEGylated Polymer - Based Nanoparticles for Drug Delivery to the Brain*. Colloid Stability, 2007: p. 409-428.
79. Vauthier, C. and P. Couvreur, *Nanomedicines: a new approach for the treatment of serious diseases*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**(3): p. 223-234.
80. Tamilvanan, S., *Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems*. Progress in lipid research, 2004. **43**(6): p. 489-533.
81. Malmsten, M., *Surfactants and polymers in drug delivery*. Vol. 122. 2002: Marcel Dekker New York.
82. Jeppsson, R. and S. Ljungberg, *Anticonvulsant activity in mice of diazepam in an emulsion formulation for intravenous administration*. Acta pharmacologica et toxicologica, 1975. **36**(4): p. 312-320.
83. Lawrence, M.J. and W. Warisnoicharoen, *Recent Advances in Microemulsions as Drug Delivery Vehicles, in Nanoparticulates as Drug Carriers*. 2012, PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO. p. 125-171.
84. Junping, W., et al., *Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol*. International journal of pharmaceutics, 2003. **251**(1): p. 13-21.
85. Rijcken, C.J.F., et al., *Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2007. **120**(3): p. 131-148.
86. Meng, F., G.H.M. Engbers, and J. Feijen, *Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: encapsulation, release and targeting*. Journal of Controlled Release, 2005. **101**(1–3): p. 187-198.
87. Ahmed, F., et al., *Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug*. Journal of Controlled Release, 2006. **116**(2): p. 150-158.
88. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(1): p. 3-12.
89. Bae, Y.H. and S.W. Kim, *Modern Hydrogel Delivery Systems Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block co-polymers or interpenetrating networks*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1993. **11**(1): p. 109-135.
90. Yuk, S.H., S.H. Cho, and S.H. Lee, *pH/Temperature-Responsive Polymer Composed of Poly((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide)*. Macromolecules, 1997. **30**(22): p. 6856-6859.
91. Heller, A., et al., *Small Volume In Vitro Analyte Sensor*, 2016, Google Patents.
92. Soussan, E., et al., *Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(2): p. 274-288.
93. Duncan, R., *The dawning era of polymer therapeutics*. Nature Reviews, 2003. **2**: p. 347-360.

94. Tamaki, Y., *Prospects for nanomedicine in treating age-related macular degeneration*. *Nanomedicine*, 2009. **4**(3): p. 341-352.
95. Nishiyama, N. and K. Kataoka, *Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery*. *Pharmacology and Therapeutics*, 2006. **112**: p. 630-648.
96. De Santis, S., et al., *Pegylated and thermosensitive polyion complex micelles by self-assembly of two oppositely and permanently charged diblock copolymers*. *Macromolecules*, 2010. **43**(4): p. 1992-2001.
97. Gohy, J.-F., et al., *Water-Soluble Complexes Formed by Sodium Poly (4-styrenesulfonate) and a Poly (2-vinylpyridinium)-b lock-poly (ethyleneoxide) Copolymer*. *Macromolecules*, 2000. **33**(25): p. 9298-9305.
98. Warnant, J., et al., *Physicochemical properties of pH-controlled polyion complex (PIC) micelles of poly (acrylic acid)-based double hydrophilic block copolymers and various polyamines*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012. **403**(5): p. 1395-1404.
99. Pergushov, D.V., A.H. Müller, and F.H. Schacher, *Micellar interpolyelectrolyte complexes*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(21): p. 6888-6901.
100. Jang, W.D., et al., *Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with polyethylene glycol to enhance intracellular photodynamic efficacy*. *Angewandte Chemie*, 2005. **117**(3): p. 423-427.
101. Ideta, R., et al., *Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer*. *Nano letters*, 2005. **5**(12): p. 2426-2431.
102. Chen, J., et al., *Polyion complex micelles with gradient pH-sensitivity for adjustable intracellular drug delivery*. *Polymer Chemistry*, 2015. **6**(3): p. 397-405.
103. Wang, J., et al., *Selective intracellular drug delivery from pH-responsive polyion complex micelle for enhanced malignancy suppression in vivo*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015. **135**: p. 283-290.
104. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy-promises, problems and prospects*. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 239-242.
105. Pack, D.W., et al., *Design and development of polymers for gene delivery*. *Nature reviews Drug discovery*, 2005. **4**(7): p. 581-593.
106. Boeckle, S., et al., *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer*. *The journal of gene medicine*, 2004. **6**(10): p. 1102-1111.
107. Shalviri, A., et al., *Design of pH-responsive nanoparticles of terpolymer of poly (methacrylic acid), polysorbate 80 and starch for delivery of doxorubicin*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **101**: p. 405-413.
108. Nukolova, N.V., et al., *Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer*. *Biomaterials*, 2011. **32**(23): p. 5417-5426.
109. Yang, C., et al., *Supramolecular nanostructures designed for high cargo loading capacity and kinetic stability*. *Nano Today*, 2010. **5**(6): p. 515-523.
110. Kim, J.O., A.V. Kabanov, and T.K. Bronich, *Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin*. *Journal of Controlled Release*, 2009. **138**(3): p. 197-204.
111. Huang, Y.-C., M. Arham, and J.-S. Jan, *Bioactive vesicles from saccharide-and hexanoyl-modified poly (L-lysine) copolypeptides and evaluation of the cross-linked vesicles as carriers of doxorubicin for controlled drug release*. *European Polymer Journal*, 2013. **49**(3): p. 726-737.

112. van Nostrum, C.F., *Covalently cross-linked amphiphilic block copolymer micelles*. Soft Matter, 2011. **7**(7): p. 3246-3259.
113. Chang, L., et al., *Poly(ethyleneglycol)-b-poly(e-caprolactone-co-g-hydroxyl-e-caprolactone) bearing pendant hydroxyl groups as nanocarriers for doxorubicin delivery*. Biomacromolecules, 2012. **13**: p. 3301-3310.
114. Emoto, K., Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *Coating of Surfaces with Stabilized Reactive Micelles from Poly(ethylene glycol)-b-Poly(dl-lactic acid) Block Copolymer*. Langmuir, 1999. **15**(16): p. 5212-5218.
115. Wu, Y., et al., *Core-crosslinked pH-sensitive degradable micelles: a promising approach to resolve the extracellular stability versus intracellular drug release dilemma*. Journal of controlled release, 2012. **164**(3): p. 338-345.
116. Danquah, M., T. Fujiwara, and R.I. Mahato, *Lactic acid - and carbonate - based crosslinked polymeric micelles for drug delivery*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2013. **51**(2): p. 347-362.
117. Jiménez - Pardo, I., et al., *Shell Cross - Linked Polymeric Micelles as Camptothecin Nanocarriers for Anti - HCV Therapy*. Macromolecular bioscience, 2015. **15**(10): p. 1381-1391.
118. Wang, F., et al., *Metal Coordination Mediated Reversible Conversion between Linear and Cross - Linked Supramolecular Polymers*. Angewandte Chemie, 2010. **122**(6): p. 1108-1112.
119. Wu, X., et al., *Modeling and self-assembly behavior of PEG-PLA-PEG triblock copolymers in aqueous solution*. Nanoscale, 2013. **5**(19): p. 9010-9017.
120. Zhao, Y., et al., *Well-constructed single-layer molybdenum disulfide nanorose cross-linked by three dimensional-reduced graphene oxide network for superior water splitting and lithium storage property*. Scientific reports, 2015. **5**.
121. Qiu, X., et al., *Alkyl chain cross-linked sulfobutylated lignosulfonate: a highly efficient dispersant for carbendazim suspension concentrate*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015. **3**(7): p. 1551-1557.
122. Li, Y., et al., *Well-defined, reversible disulfide cross-linked micelles for on-demand paclitaxel delivery*. Biomaterials, 2011. **32**(27): p. 6633-6645.
123. Wei, R., et al., *Reduction-responsive disassemblable core-cross-linked micelles based on poly (ethylene glycol)-b-poly (N-2-hydroxypropyl methacrylamide)-lipoic acid conjugates for triggered intracellular anticancer drug release*. Biomacromolecules, 2012. **13**(8): p. 2429-2438.
124. Gao, C., et al., *pH/redox responsive core cross-linked nanoparticles from thiolated carboxymethyl chitosan for in vitro release study of methotrexate*. Carbohydrate polymers, 2014. **111**: p. 964-970.
125. Hu, X., et al., *Thiol and pH dual-responsive dynamic covalent shell cross-linked micelles for triggered release of chemotherapeutic drugs*. Polymer Chemistry, 2013. **4**(3): p. 695-706.
126. Hu, X., et al., *Photo-triggered release of caged camptothecin prodrugs from dually responsive shell cross-linked micelles*. Macromolecules, 2013. **46**(15): p. 6243-6256.
127. Wang, H., et al., *Redox-responsive, core-cross-linked micelles capable of on-demand, concurrent drug release and structure disassembly*. Biomacromolecules, 2013. **14**(10): p. 3706-3712.
128. Synatschke, C.V., et al., *Multicompartment micelles with adjustable poly (ethylene glycol) shell for efficient in vivo photodynamic therapy*. ACS nano, 2014. **8**(2): p. 1161-1172.
129. Wang, X., et al., *Concurrent Block Copolymer Polymersome Stabilization and Bilayer Permeabilization by Stimuli-Regulated "Traceless" Crosslinking*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(12): p. 3138-3142.

130. Zhou, Z., et al., *Tumor targeting by pH-sensitive, biodegradable, cross-linked N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer micelles*. *Biomaterials*, 2014. **35**(24): p. 6622-6635.
131. Fu, Z., et al., *Magnetic polar post-cross-linked resin and its adsorption towards salicylic acid from aqueous solution*. *Chemical Engineering Journal*, 2015. **273**: p. 240-246.
132. Kocak, G. and V. Bütün, *Synthesis and stabilization of Pt nanoparticles in core cross-linked micelles prepared from an amphiphilic diblock copolymer*. *Colloid and Polymer Science*, 2015. **293**(12): p. 3563-3572.
133. Xu, J., et al., *Enhanced photodynamic efficiency achieved via a dual-targeted strategy based on photosensitizer/micelle structure*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(11): p. 4249-4259.
134. Yan, L., et al., *Photo-cross-linked mPEG-poly (γ -cinnamyl-L-glutamate) micelles as stable drug carriers*. *Polymer Chemistry*, 2012. **3**(5): p. 1300-1307.
135. Liu, G., et al., *Self-Immolative Polymersomes for High-Efficiency Triggered Release and Programmed Enzymatic Reactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. **136**(20): p. 7492-7497.
136. Kumar, V.A., et al., *Drug-triggered and cross-linked self-assembling nanofibrous hydrogels*. *Journal of the American Chemical Society*, 2015. **137**(14): p. 4823-4830.
137. Rajdev, P., D. Basak, and S. Ghosh, *Insights into Noncovalently Core Cross-Linked Block Copolymer Micelles by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Studies*. *Macromolecules*, 2015. **48**(10): p. 3360-3367.
138. Shi, Y., et al., *Complete regression of xenograft tumors upon targeted delivery of paclitaxel via Π - Π stacking stabilized polymeric micelles*. *ACS nano*, 2015. **9**(4): p. 3740-3752.
139. Zhao, Y., et al., *pH-responsive polymeric micelles based on poly (2-ethyl-2-oxazoline)-poly (D, L-lactide) for tumor-targeting and controlled delivery of doxorubicin and P-glycoprotein inhibitor*. *Acta biomaterialia*, 2015. **17**: p. 182-192.
140. Herlambang, S., et al., *Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy*. *Journal of controlled release*, 2011. **155**(3): p. 449-457.
141. Kakizawa, Y., A. Harada, and K. Kataoka, *Environment-sensitive stabilization of core-shell structured polyion complex micelle by reversible cross-linking of the core through disulfide bond*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**(48): p. 11247-11248.
142. Maggi, F., et al., *Chitosan nanogels by template chemical cross-linking in polyion complex micelle nanoreactors*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(10): p. 3499-3507.
143. Wang, J., et al., *Imine bond cross-linked poly (ethylene glycol)-block-poly (aspartamide) complex micelle as a carrier to deliver anticancer drugs*. *RSC Advances*, 2014. **4**(22): p. 11244-11250.
144. Zhang, J., et al., *Polyion complex micelles possessing thermoresponsive coronas and their covalent core stabilization via "click" chemistry*. *Macromolecules*, 2008. **41**(4): p. 1444-1454.
145. Meng, F. and Z. Zhong, *Polymersomes Spanning from Nano- to Microscales: Advanced Vehicles for Controlled Drug Delivery and Robust Vesicles for Virus and Cell Mimicking*. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011. **2**(13): p. 1533-1539.
146. Maret, G., *Diffusing-wave spectroscopy*. *Current opinion in colloid & interface science*, 1997. **2**(3): p. 251-257.
147. Pecora, R., *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. 2013: Springer Science & Business Media.

148. Instruments, M., *Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes*. Technical Note Malvern, MRK656-01, 2012: p. 1-8.
149. Till, U., et al., *Self-assembled polymeric vectors mixtures: characterization of the polymorphism and existence of synergistic effects in photodynamic therapy*. Nanotechnology, 2016. **27**(31): p. 315102.
150. Berne, B.J. and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. 1976: Courier Corporation.
151. Perico, A., P. Piaggio, and C. Cuniberti, *Dynamics of chain molecules. II. Spectral distribution of the light scattered from flexible macromolecules*. The Journal of Chemical Physics, 1975. **62**(7): p. 2690-2695.
152. Chu, B., *Structure and dynamics of block copolymer colloids*. Langmuir, 1995. **11**(2): p. 414-421.
153. Chu, B., *Laser light scattering*. 1974: Elsevier.
154. Overbeck, E. and C. Sinn, *Three-dimensional dynamic light scattering*. Journal of Modern Optics, 1999. **46**(2): p. 303-326.
155. Pusey, P., *Suppression of multiple scattering by photon cross-correlation techniques*. Current opinion in colloid & interface science, 1999. **4**(3): p. 177-185.
156. Sun, S.T., et al., *The coil-globule transition: radius of gyration of polystyrene in cyclohexane*. The Journal of Chemical Physics, 1980. **73**(12): p. 5971-5975.
157. Kirby, B.J., *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*. 2010: Cambridge University Press.
158. Canseco Ruiz, V., *Transport de colloïdes en milieu poreux: étude expérimentale*, 2009, Bordeaux 1.
159. Sameut Bouhaik, I., *Modélisation multi-échelles du transport réactif des nanoparticules dans l'environnement*, 2014, Orléans.
160. Hunter, R.J., *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Vol. 2. 2013: Academic press.
161. Norde, W., *Emulsions and Foams Colloids and Interfaces in Life Sciences (pp. 365-381)*, 2003, Marcel Dekker, Inc.
162. Hiemenz, P.C. and R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*. Vol. 14. 1997: CRC press.
163. Delgado, Á.V., et al., *Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena*. Journal of colloid and interface science, 2007. **309**(2): p. 194-224.
164. Djehiche, A., et al., *Experimental study of colloidal particles deposit in porous media: hydrodynamics and salinity effects*. COMPTES RENDUS MECANIQUE, 2009. **337**(9-10): p. 682-692.
165. Pasch, H., et al., *Analysis of complex polymers by multidetector field-flow fractionation*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2013.
166. Myers, M.N., *Overview of field -flow fractionation*. Journal of Microcolumn Separations, 1997. **9**(3): p. 151-162.
167. Schimpf, M.E., K. Caldwell, and J.C. Giddings, *Field-flow fractionation handbook*. 2000: John Wiley & Sons.
168. Janca, J. and F.-F. Fractionation, *Analysis of Macromolecules and Particles*. Chromatographic Science Series, 1988. **39**.
169. Benincasa, M.A. and J.C. Giddings, *Separation and characterization of cationic, anionic, and nonionic water - soluble polymers by flow FFF: Sample recovery, overloading, and ionic strength effects*. Journal of Microcolumn Separations, 1997. **9**(6): p. 479-495.

170. Giddings, J.C., *Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials*. Science, 1993. **260**(5113): p. 1456-1465.
171. Ratanathanawongs Williams, S.K. and D. Lee, *Field - flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies*. Journal of separation science, 2006. **29**(12): p. 1720-1732.
172. Lee, H., et al., *Analysis of whole bacterial cells by flow field-flow fractionation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2003. **75**(11): p. 2746-2752.
173. Zattoni, A., et al., *Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **87**(0): p. 53-61.
174. Giddings, J.C., *A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities*. Separation Science, 1966. **1**(1): p. 123-125.
175. Thompson, G.H., M.N. Myers, and J.C. Giddings, *An observation of a field-flow fractionation effect with polystyrene samples*. Separation Science, 1967. **2**(6): p. 797-800.
176. Mélin, C., et al., *Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(3): p. 1549-1556.
177. Esposito, E., et al., *Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin*. Pharmaceutical research, 2005. **22**(12): p. 2163-2173.
178. Contado, C., L. Ravani, and M. Passarella, *Size characterization by sedimentation field flow fractionation of silica particles used as food additives*. Analytica chimica acta, 2013. **788**: p. 183-192.
179. Esposito, E., et al., *Nanoparticulate lipid dispersions for bromocriptine delivery: characterization and in vivo study*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. **80**(2): p. 306-314.
180. Esposito, E., et al., *Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(1): p. 411-418.
181. Greyling, G. and H. Pasch, *Multidetector Thermal Field - Flow Fractionation as a Novel Tool for the Microstructure Separation of Polyisoprene and Polybutadiene*. Macromolecular rapid communications, 2014. **35**(21): p. 1846-1851.
182. Greyling, G. and H. Pasch, *Tacticity Separation of Poly (methyl methacrylate) by Multidetector Thermal Field-Flow Fractionation*. Analytical chemistry, 2015. **87**(5): p. 3011-3018.
183. Cao, W., et al., *Thermal field-flow fractionation universal calibration: Extension for consideration of variation of cold wall temperature*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(8): p. 1597-1609.
184. Messaud, F.A., et al., *An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(4): p. 351-368.
185. Caldwell, K.D., et al., *Electrical field-flow fractionation of proteins*. Science, 1972. **176**(4032): p. 296-298.
186. Gale, B.K., K.D. Caldwell, and A.B. Frazier, *A micromachined electrical field-flow fractionation (/spl mu/-EFFF) system*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1998. **45**(12): p. 1459-1469.
187. Johann, C., et al., *Instrument and Method to Determine the Electrophoretic Mobility of Nanoparticles and Proteins by Combining Electrical and Flow Field-Flow Fractionation*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(8): p. 4292-4298.
188. Noskov, S., C. Scherer, and M. Maskos, *Determination of Hamaker constants of polymeric nanoparticles in organic solvents by asymmetrical flow field-flow fractionation*. Journal of Chromatography A, 2013. **1274**: p. 151-158.

189. Wahlund, K.-G., *Flow field-flow fractionation: Critical overview*. Journal of Chromatography A, 2013. **1287**(0): p. 97-112.
190. Ma, P.L., M.D. Buschmann, and F.M. Winnik, *One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content*. Biomacromolecules, 2010. **11**(3): p. 549-554.
191. Shimoda, A., et al., *Dual crosslinked hydrogel nanoparticles by nanogel bottom-up method for sustained-release delivery*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **99**: p. 38-44.
192. Gigault, J., et al., *Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial*. Analytica Chimica Acta, 2014. **809**(0): p. 9-24.
193. Moon, M.H. and I. Hwang, *Hydrodynamic vs. focusing relaxation in asymmetrical flow field-flow fractionation*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2001. **24**(20): p. 3069-3083.
194. Wahlund, K.G. and J.C. Giddings, *Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(9): p. 1332-1339.
195. Ratanathanawongs, S.K. and J.C. Giddings, *Particle-size analysis using flow field-flow fractionation*. in ACS Symposium Series. 1993. AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036.
196. Lee, S., et al., *Determination of mean diameter and particle size distribution of acrylate latex using flow field-flow fractionation, photon correlation spectroscopy, and electron microscopy*. Analytical chemistry, 1996. **68**(9): p. 1545-1549.
197. Benincasa, M.A. and J.C. Giddings, *Separation and molecular weight distribution of anionic and cationic water-soluble polymers by flow field-flow fractionation*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(7): p. 790-798.
198. Ratanathanawongs, S.K. and J.C. Giddings, *Dual-field and flow-programmed lift hyperlayer field-flow fractionation*. Analytical chemistry, 1992. **64**(1): p. 6-15.
199. Moon, M.H., I. Park, and Y. Kim, *Size characterization of liposomes by flow field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy: Effect of ionic strength and pH of carrier solutions*. Journal of Chromatography A, 1998. **813**(1): p. 91-100.
200. Wahlund, K.-G. and A. Litzen, *Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae*. Journal of Chromatography A, 1989. **461**: p. 73-87.
201. Litzen, A. and K.-G. Wahlund, *Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation*. Journal of Chromatography A, 1989. **476**: p. 413-421.
202. Li, P., M. Hansen, and J.C. Giddings[†], *Separation of lipoproteins from human plasma by flow field-flow fractionation*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 1997. **20**(16-17): p. 2777-2802.
203. Giddings, J.C., et al., *Separation of water soluble synthetic and biological macromolecules by flow field-flow fractionation*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 1992. **15**(10): p. 1729-1747.
204. Moon, M.H., H. Kwon, and I. Park, *Stopless flow injection in asymmetrical flow field-flow fractionation using a frit inlet*. Analytical chemistry, 1997. **69**(7): p. 1436-1440.
205. Moon, M.H., P.S. Williams, and H. Kwon, *Retention and efficiency in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2657-2666.
206. Moon, M.H., et al., *Separation of carbon nanotubes by frit inlet asymmetrical flow field - flow fractionation*. Journal of separation science, 2004. **27**(9): p. 710-717.

207. Park, I., et al., *Separation and selective detection of lipoprotein particles of patients with coronary artery disease by frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation*. Journal of Chromatography B, 2002. **780**(2): p. 415-422.
208. Monnereau, A., et al., *Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012: partie 2—hémopathies malignes*. Saint-Maurice, France: Institut de veille sanitaire, 2013.
209. Cruz, J.A. and D.S. Wishart, *Applications of machine learning in cancer prediction and prognosis*. Cancer informatics, 2006. **2**.
210. Good, N.M., et al., *A prediction model for colon cancer surveillance data*. Statistics in medicine, 2015. **34**(18): p. 2662-2675.
211. Krishnaiah, V., D.G. Narsimha, and D.N.S. Chandra, *Diagnosis of lung cancer prediction system using data mining classification techniques*. International Journal of Computer Science and Information Technologies, 2013. **4**(1): p. 39-45.
212. Colditz, G.A. and E.K. Wei, *Risk Prediction Models: Applications in Cancer Prevention*. Current Epidemiology Reports, 2015. **2**(4): p. 245-250.
213. Friedrich, J., et al., *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. Nature protocols, 2009. **4**(3): p. 309-324.
214. Ingargiola, M., et al., *Potential of a Cetuximab - based radioimmunotherapy combined with external irradiation manifests in a 3 - D cell assay*. International journal of cancer, 2014. **135**(4): p. 968-980.
215. Kadletz, L., et al., *Evaluation of spheroid head and neck squamous cell carcinoma cell models in comparison to monolayer cultures*. Oncology letters, 2015. **10**(3): p. 1281-1286.
216. Gibot, L., et al., *Polymeric micelles encapsulating photosensitizer: structure/photodynamic therapy efficiency relation*. Biomacromolecules, 2014. **15**(4): p. 1443-1455.
217. Gibot, L., et al., *Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation*. J Control Release, 2013. **167**(2): p. 138-47.
218. andYi Lu, L.L., *Optimizing a 3D culture system to study the interaction between epithelial breast cancer and its surrounding fibroblasts*. Journal of Cancer, 2011. **2**: p. 458-466.
219. Weaver, V., et al., *The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay*. Biochemistry and cell biology, 1996. **74**(6): p. 833-851.
220. Petersen, O.W., et al., *Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(19): p. 9064-9068.
221. Bissell, M.J., *The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture*. International review of cytology, 1981. **70**: p. 27-100.
222. Gibot, L., et al. *Mixed Spheroids as a Relevant 3D Biological Tool to Understand Therapeutic Window of Electrochemotherapy*. in *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*. 2016. Springer.
223. Auger, F.A., L. Gibot, and D. Lacroix, *The pivotal role of vascularization in tissue engineering*. Annual review of biomedical engineering, 2013. **15**: p. 177-200.
224. Ohmori, T., et al., *Blockade of tumor cell transforming growth factor- β s enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy*. Experimental cell research, 1998. **245**(2): p. 350-359.

225. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nature reviews Molecular cell biology, 2006. **7**(3): p. 211-224.
226. Kim, J.B. *Three-dimensional tissue culture models in cancer biology*. in *Seminars in cancer biology*. 2005. Elsevier.
227. Rak, J., et al., *Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant cH-ras oncogene expression*. The Journal of cell biology, 1995. **131**(6): p. 1587-1598.
228. Ho, V.H., et al., *Manipulating magnetic 3D spheroids in hanging drops for applications in tissue engineering and drug screening*. Advanced healthcare materials, 2013. **2**(11): p. 1430-1434.
229. Walker, T. and A. Woodrooffe, *Cytochrome P450 activity in control and induced long-term cultures of rat hepatocyte spheroids*. Toxicology in vitro, 2001. **15**(6): p. 713-719.
230. Hirschhaeuser, F., et al., *Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again*. Journal of biotechnology, 2010. **148**(1): p. 3-15.
231. Astashkina, A., B. Mann, and D.W. Grainger, *A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity*. Pharmacology & therapeutics, 2012. **134**(1): p. 82-106.
232. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. Journal of biomolecular screening, 2004. **9**(4): p. 273-285.
233. Vörsmann, H., et al., *Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing*. Cell death & disease, 2013. **4**(7): p. e719.
234. Yoshii, Y., et al., *The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation*. Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6052-6058.
235. Sutherland, R., et al., *Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma*. Cancer research, 1986. **46**(10): p. 5320-5329.
236. Ho, V.H., N.K. Slater, and R. Chen, *pH-responsive endosomolytic pseudo-peptides for drug delivery to multicellular spheroids tumour models*. Biomaterials, 2011. **32**(11): p. 2953-2958.
237. Ng, K.W., et al., *Assimilating cell sheets and hybrid scaffolds for dermal tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **75**(2): p. 425-438.
238. Ng, K.W., D.T. Leong, and D.W. Hutmacher, *The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions*. Tissue Engineering, 2005. **11**(1-2): p. 182-191.
239. Zhang, S., F. Gelain, and X. Zhao. *Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures*. in *Seminars in cancer biology*. 2005. Elsevier.
240. Nichols, J.E., et al., *In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry*. Biomaterials, 2009. **30**(6): p. 1071-1079.
241. Hofmann, A., et al., *The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds*. Biomaterials, 2008. **29**(31): p. 4217-4226.
242. Chung, S., et al., *Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform*. Lab on a Chip, 2009. **9**(2): p. 269-275.
243. Fischbach, C., et al., *Engineering tumors with 3D scaffolds*. Nature methods, 2007. **4**(10): p. 855-860.
244. Huh, D., G.A. Hamilton, and D.E. Ingber, *From 3D cell culture to organs-on-chips*. Trends in cell biology, 2011. **21**(12): p. 745-754.

245. Bhise, N.S., et al., *Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2014. **190**: p. 82-93.
246. Hwang, C.M., et al., *Microfluidic chip-based fabrication of PLGA microfiber scaffolds for tissue engineering*. Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6845-6851.
247. Mueller, D., et al., *3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies*. Toxicology in Vitro, 2014. **28**(1): p. 104-112.
248. Kathawala, M.H., et al., *Emerging In Vitro Models for Safety Screening of High - Volume Production Nanomaterials under Environmentally Relevant Exposure Conditions*. Small, 2013. **9**(9 - 10): p. 1504-1520.
249. Meng, W., et al., *Evaluation of poly (glycerol-adipate) nanoparticle uptake in an in vitro 3-D brain tumor co-culture model*. Experimental Biology and Medicine, 2007. **232**(8): p. 1100-1108.
250. Jain, M.P., et al., *Probing and preventing quantum dot-induced cytotoxicity with multimodal α -lipoic acid in multiple dimensions of the peripheral nervous system*. 2009.
251. Brandenburger, M., et al., *Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium*. Cardiovascular research, 2012. **93**(1): p. 50-59.
252. Leong, D.T. and K.W. Ng, *Probing the relevance of 3D cancer models in nanomedicine research*. Advanced drug delivery reviews, 2014. **79**: p. 95-106.
253. Hirschhaeuser, F., S. Walenta, and W. Mueller-Klieser, *Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action*. Cancer immunology, immunotherapy, 2010. **59**(11): p. 1675-1684.
254. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions : the multicell spheroid model*. Science (Washington, D. C.), 1988. **240**: p. 177-184.
255. Mueller-Klieser, W.F. and R.M. Sutherland, *Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids*. Cancer research, 1982. **42**(1): p. 237-242.
256. Rodríguez - Enríquez, S., et al., *Energy metabolism transition in multi - cellular human tumor spheroids*. Journal of cellular physiology, 2008. **216**(1): p. 189-197.
257. Leong, D.T. and K.W. Ng, *Probing the relevance of 3D cancer models in nanomedicine research*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014. **79–80**: p. 95-106.
258. Elliott, N.T. and F. Yuan, *A review of three - dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies*. Journal of pharmaceutical sciences, 2011. **100**(1): p. 59-74.
259. KUNZ - SCHUGHART, L.A., M. Kreutz, and R. Knuechel, *Multicellular spheroids: a three - dimensional in vitro culture system to study tumour biology*. International journal of experimental pathology, 1998. **79**(1): p. 1-23.
260. Friedrich, J., R. Ebner, and L.A. Kunz-Schughart, *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge?* International journal of radiation biology, 2007. **83**(11-12): p. 849-871.
261. Watanabe, N., R. Hirayama, and N. Kubota, *The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cells grown as monolayers and spheroids*. Journal of radiation research, 2007. **48**(1): p. 45-50.
262. Russell, J., T.E. Wheldon, and P. Stanton, *A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis*. Cancer research, 1995. **55**(21): p. 4915-4921.
263. Marušić, M., et al., *Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models*. Cell proliferation, 1994. **27**(2): p. 73-94.

264. Tabatabai, M., D.K. Williams, and Z. Bursac, *Hyperbolic growth models: theory and application*. Theoretical Biology and Medical Modelling, 2005. **2**(1): p. 1.
265. Kosaka, T., et al., *Spheroid cultures of human hepatoblastoma cells (HuH-6 line) and their application for cytotoxicity assay of alcohols*. Acta medica Okayama, 1996. **50**(2): p. 61-66.
266. Mellor, H., D. Ferguson, and R. Callaghan, *A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs*. British journal of cancer, 2005. **93**(3): p. 302-309.
267. Dionzou, M., et al., *Comparison of methods for the fabrication and the characterization of polymer self-assemblies: what are the important parameters*. Soft Matter, 2016. **12**(7): p. 2166-2176.
268. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 505-515.
269. Ehrhart, J., A.F. Mingotaud, and F. Violleau, J. Chromatogr. A, 2011. **1218**: p. 4249.
270. Lee, S.-W., et al., *Development of docetaxel-loaded intravenous formulation, nanoxel-PM using polymer-based delivery system*. Journal of Controlled Release, 2011. **155**: p. 262-271.
271. Tang, P.M., et al., *Phéophorbide a based photodynamic therapy induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in human uterine carcinosarcoma*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(6): p. 533-9.
272. Venkataraman, S., et al., *The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(14–15): p. 1228-1246.
273. Sachl, R., et al., *Preparation and Characterization of Self-Assembled Nanoparticles Formed by Poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) Copolymers with Long Poly(ϵ -caprolactone) Blocks in Aqueous Solutions*. Langmuir, 2007. **23**(6): p. 3395-3400.
274. Gibot, L., et al., *Polymeric Micelles Encapsulating Photosensitizer: Structure/Photodynamic Therapy Efficiency Relation*. Biomacromolecules, 2014. **15**(4): p. 1443-1455.
275. Lu, H., et al., *Enhanced transcellular penetration and drug delivery by crosslinked polymeric micelles into pancreatic multicellular tumor spheroids*. Biomaterials science, 2015. **3**(7): p. 1085-1095.
276. Rijcken, C.J.F., et al., *Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterization and in vivo studies*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 5581-5593.
277. Iijima, M., et al., *Core-Polymerized Reactive Micelles from Heterotelechelic Amphiphilic Block Copolymers*. Macromolecules, 1999. **32**(4): p. 1140-1146.
278. Shuai, X., et al., *Core-crosslinked polymeric micelles as paclitaxel carriers*. Bioconjugate chemistry, 2004. **15**: p. 441-448.
279. *report from European Commission/ETP nanomedicine "roadmaps in nanomedicine towards 2020"* <http://www.etp-nanomedicine.eu/public/press-documents/publications/etpn-publications/091022_ETPN_Report_2009.pdf/at_download/file>.
280. Gentile, F., et al., *The effect of shape on the margination dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows*. Journal of Biomechanics, 2008. **41**(10): p. 2312-2318.
281. Le Cerf, D., et al., *Contribution of flow field flow fractionation with on line static and dynamic light scattering to the study of hydrosoluble polyelectrolyte complexes*. Analytica chimica acta, 2007. **604**(1): p. 2-8.
282. Yohannes, G., et al., *Characterisation of poly (N - isopropylacrylamide) by asymmetrical flow field - flow fractionation, dynamic light scattering, and size exclusion chromatography*. Journal of separation science, 2005. **28**(5): p. 435-442.

283. Qureshi, R.N. and W.T. Kok, *Application of flow field-flow fractionation for the characterization of macromolecules of biological interest: a review*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **399**(4): p. 1401-1411.
284. Pekel, N. and O. Güven, *Investigation of complex formation between poly (N-vinyl imidazole) and various metal ions using the molar ratio method*. Colloid and Polymer Science, 1999. **277**(6): p. 570-573.
285. Katayose, S. and K. Kataoka, *Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) block copolymer*. Bioconjugate chemistry, 1997. **8**(5): p. 702-707.
286. Chen, H., et al., *Polyion Complex Vesicles for Photoinduced Intracellular Delivery of Amphiphilic Photosensitizer*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(1): p. 157-163.

L'objectif de cette thèse était de mettre au point une analyse critique de vecteurs polymères utilisés pour la thérapie photodynamique (PDT) et de faire le lien avec l'efficacité thérapeutique observée. Pour cela, une analyse complète des vecteurs a été réalisée par des techniques classiques comme la diffusion dynamique de la lumière ou la microscopie électronique, mais aussi grâce au fractionnement flux-force, technique peu utilisée jusqu'à présent dans le domaine des auto-assemblages polymères. Dans un deuxième temps, les auto-assemblages ont été utilisés comme vecteurs d'un photosensibilisateur, le Phéophorbide a, et l'efficacité thérapeutique évaluée en travaillant sur culture cellulaire 2D et 3D de lignées HCT116 (cancer du colon) ou FaDu (cancer tête et cou).

Différents vecteurs polymères simples ont tout d'abord été examinés, à savoir des micelles ou des polymersomes à base de copolymères diblocs amphiphiles comme le poly(oxyde d'éthylène-b-ε-caprolactone), le poly(oxyde d'éthylène-b-lactide) ou le poly(oxyde d'éthylène-b-styrène). Ceci a permis d'obtenir des vecteurs présentant des tailles et des morphologies variables. Les résultats en PDT ont montré des comportements différents et une meilleure efficacité en 3D pour les systèmes à base de PEO-PDLLA. La technique de fractionnement flux-force asymétrique (AsFFFF) a particulièrement été utilisée pour ces vecteurs afin de démontrer la pureté des auto-assemblages.

Les connaissances acquises dans cette première partie ont permis de caractériser des vecteurs faits à base de mélanges d'auto-assemblages micelles/vésicules. Ceux-ci ont révélé des phénomènes d'antagonisme ou de synergie dans l'efficacité en PDT, démontrant l'existence de processus complexes au niveau de la réponse cellulaire.

Des auto-assemblages figés par réticulation ont aussi été développés, caractérisés et examinés en PDT. Ils se sont avérés extrêmement intéressants pour la PDT sur les cultures cellulaires en 3D, démontrant une efficacité accrue comparée aux systèmes simples. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus en culture 2D pour les mêmes objets a de plus permis de mettre en évidence la différence entre ces deux modèles biologiques.

Enfin, des auto-assemblages à base de complexes poly-ioniques ont aussi été formés et caractérisés. Le fractionnement flux-force s'est là encore avéré efficace, mais a nécessité l'utilisation d'une injection spéciale par Frit-inlet. Leur efficacité en PDT s'est avérée faible.

The objective of this study was to critically analyze different polymer self-assemblies used for photodynamic therapy (PDT) and to link this analysis to their therapeutic efficiency. To do that, a thorough characterization of the vectors has been performed by classical techniques such as Dynamic Light Scattering or electron Microscopy, but also using flow fractionation, which has been seldomly used so far for polymeric self-assemblies. In a second step, these have been used as vectors of a photosensitizer, namely Phéophorbide a, and the therapeutic efficiency assessed on both 2D and 3D cell cultures of HCT 116 (colon cancer) and FaDu (head and neck cancer) cells.

Different simple polymer vectors have first been evaluated, namely micelles and polymersomes based on diblock amphiphilic copolymers such as poly(ethylene-oxide-b-ε-caprolactone), poly(ethylene-oxide-b-lactide) or poly(ethylene-oxide-b-styrene). This enabled obtaining vectors exhibiting various sizes and morphologies. Results in PDT showed different behaviours and a better efficiency in 3D for PEO-PDLLA. The Asymmetric Flow Field Flow Fractionation was particularly used for these systems to demonstrate their purity. The acquired expertise on this part enabled us to also characterize vectors made of known mixtures of micelles and polymersomes. These revealed antagonism and synergy effects in PDT, demonstrating the presence of complex processes for the cell response.

Other self-assemblies consisting of crosslinked systems have also been developed and characterized. These were observed to be particularly efficient for PDT on 3D cell cultures. The comparison of these results with those for the 2D cell culture enabled to highlight the difference between those two biological systems.

Finally, self-assemblies based on Polyion Complexes were also formed and characterized. Field Flow Fractionation was once again used as a powerful technique for this, although this implied the use of a special injection device called Frit Inlet. Their PDT efficiency however proved to be low.